

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung  
der Philipps-Universität Marburg  
Direktor: Prof. Dr. Müller

---

Reifung und Migration von Langerhanszellen nach Stimulation durch  
liposomale Antigene – ein murines Modell zur transcutanen Tumorstimmung

## INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
**Jan Harbrecht**  
aus Mannheim

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
28.7.2005.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereich.

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. Müller

Korreferent: PD Dr. Hörsch

## Inhaltsverzeichnis:

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Vaccinierung.....</b>	<b>7</b>
1.1.1	Methoden der Vaccinierung .....	7
<b>1.2</b>	<b>Transkutane Immunisierung .....</b>	<b>8</b>
1.2.1	Die Haut .....	8
1.2.2	Aufbau der Epidermis .....	9
1.2.3	Haut als Immunorgan .....	10
<b>1.3</b>	<b>Antigenpräsentierende Zellen .....</b>	<b>10</b>
1.3.1	Dendritische Zellen .....	12
1.3.2	Reifung von Dendritischen Zellen.....	14
1.3.3	Toleranz.....	15
1.3.4	Langerhanszellen.....	16
<b>1.4</b>	<b>Erkennung von Antigenen durch das angeborene Immunsystem .....</b>	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>MHC-Restriktion bei Antigenpräsentation .....</b>	<b>17</b>
<b>1.6</b>	<b>Delayed type hypersensitivity.....</b>	<b>18</b>
<b>1.7</b>	<b>Ansätze der Tumervaccinierung.....</b>	<b>18</b>
<b>1.8</b>	<b>Transcutane Immunisierung mit Liposomen .....</b>	<b>20</b>
<b>1.9</b>	<b>Ziel der Arbeit .....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>23</b>
2.1.1	Mäuse .....	23
2.1.2	Antikörper gegen Mausantigene.....	23
2.1.3	Substanzen und Materialien .....	24
2.1.4	Geräte .....	26
2.1.5	Puffer und Medien.....	27
2.1.5.1	PBS-Puffer.....	27
2.1.5.2	FACS-Waschpuffer .....	27
2.1.5.3	TBS-Puffer.....	27
2.1.5.4	Komplettes Zellkulturmedium .....	28
2.1.6	Liposomen.....	28
2.1.6.1	Invasomen (PL 80-Liposomen) .....	28
2.1.6.2	PL100-Liposomen .....	29
2.1.6.3	Lecithin-Liposomen .....	29
2.1.6.4	Lecithin+Lyso-Lecithin-Liposomen .....	29
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.2.1	Applikation von Antigenen .....	30
2.2.1.1	Liposomenapplikation unter Narkose .....	30
2.2.1.2	Lösungsmittelapplikation.....	30
2.2.2	Anfertigung von Epidermal-sheets.....	30

2.2.3	Extravasation von Langerhanszellen aus Mäuseohren .....	32
2.2.4	Ernten der ausgewanderten Langerhanszellen.....	32
2.2.5	Anfertigung von Cytospins aus Langerhanszellen .....	32
2.2.6	Anfertigung einer Einzelzellsuspension aus Lymphknoten.....	33
2.2.7	FACS-Färbung der Einzelzellsuspension aus Lymphknoten .....	33
2.2.8	Immunhistochemische Färbung der Epidermal-sheets .....	34
2.2.8.1	Blocken .....	35
2.2.8.2	Färbung .....	35
2.2.9	Färben von Epidermal-sheets auf polylysinbeschichteten Objektträgern.....	37
2.2.10	APAAP-Färbung der aus Mäuseohren ausgewanderten Langerhanszellen auf Cytospins .....	37
2.2.11	FACS-Färbung der aus Mäuseohren ausgewanderten Langerhanszellen .....	38
2.2.12	Auswertung der Epidermal-sheets .....	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>40</b>
3.1	Herstellung von Epidermal-sheets.....	40
3.1.1	Präparation der Epidermis .....	41
3.2	Färben von Epidermal-sheets auf Objektträgern .....	43
3.3	Untersuchung der Verteilung von Langerhanszellen .....	44
3.4	Extravasation von Langerhanszellen in der Zellkultur .....	46
3.5	CD 86 Expression von Langerhanszellen.....	47
3.6	CD 86 Expression nach Applikation von A/D und FITC.....	48
3.7	CD 86 Expression nach Applikation von Liposomen.....	50
3.8	FACS-Messung der Leukozytenpopulation in den Lymphknoten nach Liposomenapplikation 54	
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>56</b>
4.1	Anfertigung und Beurteilung der Epidermal-sheets.....	56
4.2	Verteilung von Langerhanszellen .....	59
4.3	CD 86 Expression von Langerhanszellen.....	60
4.4	Stimulation durch FITC und Aceton-Dibutylphthalate (A/D).....	60
4.5	Zeitkinetik der CD 86 Expression.....	61
4.6	CD 86 Expression nach Applikation von Liposomen.....	62
4.7	Migration der LC nach Applikation von Liposomen.....	63
4.8	Transcutane Immunisierung .....	64
4.9	Induktion einer zytotoxischen T-Zell Reaktion .....	65
4.10	Einsatz von Liposomen bei der Tumervaccinierung.....	66

4.11	Ausblick .....	68
5	ZUSAMMENFASSUNG .....	70
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	72

## Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
A/D	Acenton-Dibuthylphthalate
APAAP	Alkalische Phosphatase – Anti - Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BCG	Bacille-Calmette-Guérin
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	clusters of differentiation
DAB	3,3'- diaminobenzidine tetrahydrochloride
DC	Dendritische Zelle
DEBR	Dundee experimental bald rat
Dgr.	Diagramm
DNA	Desoxyribonucleid acid
DTH	delayed type hypersensititvity
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluorescein 5-isothiocyanate
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Colonie stimulierender Faktor
HBSS	Hanks balanced salt solution
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA	Human leukocyte antigen
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
Ig	Immunblobulin
IL	Interleukin

---

INF	Interferon
LC	Langerhanszelle
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minuten
MLR	mixed leukocyte reaction
PAMP	pathogen associated molecular pattern
PBS	Phosphat buffered saline
RNA	Ribonucleid acid
SALT	skin associated lymphatic tissue
STIKO	Ständige Impfkommision am Robert Koch Institut
Tab.	Tabelle
TBS	Tris buffered saline
TGF	Transformed groth factor
TRP	Tyrosinase related peptide
TLR	Toll like receptor
TNF	Tumor nekrose faktor
VAPP	Vakzin assoziierte paralytische Poliomyelitis
z. B.	zum Beispiel

# **1 Einleitung**

## **1.1 Vaccinierung**

Impfen ist eine wichtige Maßnahme zur Verhinderung von Infektionskrankheiten. Durch Impfungen können viele Krankheiten wie Diphtherie, Masern, Mumps, Röteln und Polio effektiv bekämpft werden. Die Inzidenz von Infektionskrankheiten hat durch Einführung von Impfungen stark abgenommen [Abbas et Lichtman, 2003]. Die erste Impfung wurde 1794 von Edward Jenner gegen Pocken durchgeführt [Hof et al., 2000]. Seit 1980 gelten die Pocken als ausgerottet [Abbas et Lichtman, 2003].

Um eine Immunität zu erreichen, gibt es verschiedene Strategien. Bei der aktiven Impfung muss der Geimpfte selbst eine Immunreaktion gegenüber einem Erreger erzeugen. Bei der passiven Impfung werden einem Patienten Antikörper appliziert. Bei der aktiven Impfung werden attenuierte Erreger oder Teile eines Erregers dem Patienten verabreicht. Lebendimpfstoffe bestehen aus Erregern, die in ihrer Virulenz abgeschwächt sind. Totimpfstoffe bestehen aus Bruchstücken des Erregers. Auch Toxine von Erregern werden zur Immunisierung eingesetzt. Für einen wirksamen Impfschutz muss der Impfstoff an ein Trägermolekül gebunden werden. Die Trägermoleküle dienen als Adjuvants dazu, die Immunreaktion zu verstärken [Hof et al. 2000].

### **1.1.1 Methoden der Vaccinierung**

Es gibt verschiedene Wege einen Impfstoff zu applizieren. Als klassische Methoden können Vaccine oral gegeben, sowie intramuskulär, subkutan oder intrakutan injiziert werden. Der klassische Weg um Patienten zu impfen ist die Injektion in den Muskel. Die von der Ständigen Impfkommission am Robert Koch Institut (STIKO) empfohlenen Standardimpfungen werden so verabreicht [Schneeweiß, 2002].

Bei der Impfung nach Sabin wird ein attenuiertes Poliovirus oral verabreicht. Mit diesem Impfstoff gelang weltweit eine anhaltende Verdrängung der Poliomyelitis. Seit 1998 empfiehlt die STIKO den Totimpfstoff Salk, da bei der Lebendimpfung eine Vakzine

---

assoziierte paralytische Poliomyelitis (VAPP) nicht ausgeschlossen werden kann [Hof et al., 2000].

Gegen Tuberkulose kann mit attenuierten Bakterien eine partielle Immunität erreicht werden. Bei der Impfung nach Bacille-Calmette-Guérin (BCG) wird der Impfstoff streng intrakutan injiziert. Da die BCG Impfung nur partiell wirksam ist, sie jedoch die Diagnostik bei Tuberkulose erschwert, wird sie von der STIKO derzeit nicht empfohlen [Kiehl et al., 2003].

Gegen viele Krankheiten wie z. B. HIV, Hepatitis C und Malaria ist eine effektive Impfung bisher nicht möglich [O' Hagan, 2001]. Eine neue Strategie bei der Immunisierung ist die DNA-Vaccinierung mit der „Gene-gun“ Technologie. Hierbei werden Gold-Partikel mit einem Plasmid überzogen und ballistisch in die Epidermis appliziert. Dabei gelangt die DNA direkt in das Cytoplasma. Die an Zellmembranen vorhandenen DNAsen werden so ungehindert passiert. Im Tierexperiment konnte mit dieser Methode eine Immunisierung sowohl gegen Infektionskrankheiten, als auch gegen Tumore wie das Maligne Melanom nachgewiesen werden [Peachman et al., 2003].

## **1.2 Transkutane Immunisierung**

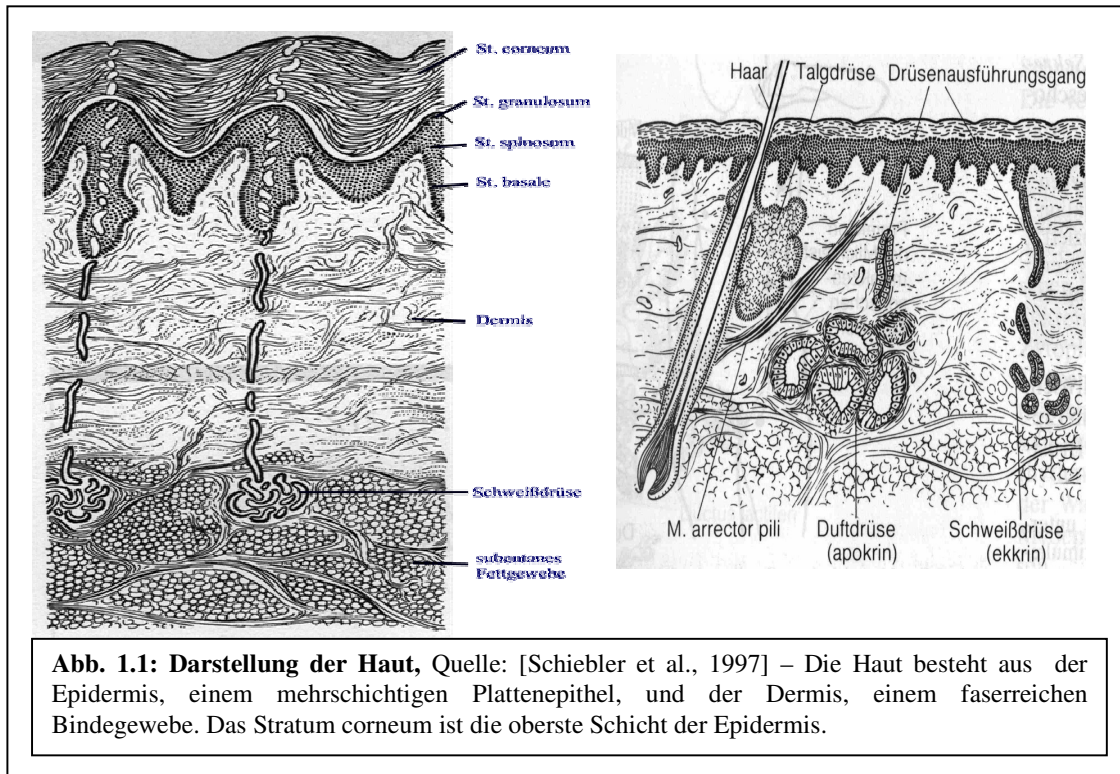
### **1.2.1 Die Haut**

Die Haut schützt den Körper vor chemischen, mechanischen und thermischen Schäden sowie vor Krankheitserregern und Strahlen. Sie ist wichtig zur Temperaturregulation und unterstützt den Körper bei der Kontrolle des Wasserhaushalts, da sie einerseits Flüssigkeit abgeben kann, andererseits den Körper vor dem Austrocknen schützt. Mit Hilfe von Rezeptoren können an der Haut Druck, Schmerz und Temperatur wahrgenommen werden [Schiebler et al., 1997].

Die Kutis besteht aus mehreren Schichten, die sich gut gegeneinander abgrenzen lassen. Oberflächlich liegt die Epidermis, ein mehrschichtiges Plattenepithel, darunter die Dermis, ein straffes faserreiches Bindegewebe. Die unter der Dermis gelegene Subkutis besteht aus gefäßreichen lockerem Bindegewebe und enthält Fettzellen [Junqueira et Carneiro, 1996].



Die Dicke der Kutis beträgt ohne Subkutis zwischen 1,5 und 4 mm. Dabei entfallen etwa 100µm auf die Epidermis [Fritsch, 1998].



### 1.2.2 Aufbau der Epidermis

Die Epidermis besteht zu 90% aus Keratinozyten, die einer Basalmembran aufsitzen. Symbiotisch mit den Keratinozyten befinden sich Langerhanszellen (LC), Melanozyten und Merkelzellen in der Epidermis. Die Versorgung erfolgt durch Diffusion aus der gefäßreichen Dermis. [Jung et Moll, 2003] Die Epidermis ist einer ständigen Erneuerung unterworfen. Die Keratinozyten entstehen aus Stammzellen der Basalschicht, durchwandern die Epidermis und durchlaufen dabei einen streng regulierten Differenzierungsgang, der in der Apoptose der Keratinozyten endet. Terminal differenziert ergeben sie die toten Korneozyten des Stratum corneums. Das Stratum corneum ist ein dünnes, durchscheinendes, reißfestes und für wasserlösliche Substanzen fast völlig undurchlässiges Häutchen, das die Epidermis wie eine Folie überzieht. Eine sukzessive Verdünnung der Hornschicht führt zu einer exponentiellen Zunahme der Durchlässigkeit [Fritsch, 1998].

Die Keratinozyten sind untereinander durch Desmosomen verbunden. Sie sind für die interzelluläre Adhärenz verantwortlich. Die Bindung der Keratinozyten an der Basalmembran wird durch Hemidesmosomen vermittelt. Diese Verbindungen sind  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  abhängig. Ein Abfangen dieser Ionen durch EDTA löst die Verbindung zur Basalmembran, so dass die Epidermis abgelöst werden kann (Material und Methoden 2.2.2) [Junqueira et Carneiro, 1996].

### **1.2.3 Haut als Immunorgan**

Die Haut ist ein komplexes Immunorgan. Sie fungiert als Schutzschild, indem sie Pathogenen den Zutritt zum Körper verwehrt [Peachman et al., 2003]. Sie ist mit Antigenpräsentierenden Zellen (APC) ausgestattet. So befinden sich zahlreiche LC in der Epidermis. Auch Keratinozyten können eine Vielzahl von Zytokinen sezernieren und so an immunologischen Reaktionen mitwirken.  $\text{TNF-}\alpha$  wirkt parakrin auf benachbarte Keratinozyten und LC [Fritsch, 1998].

Es gibt verschiedene Ansätze die Haut als Applikationsort für Impfstoffe zu nutzen. So konnte eine spezifische cytotoxische T-Zell Reaktion gegen Tumorpeptide des Malignen Melanoms im Mausmodell induziert werden [Seo et al., 2000].

## **1.3 Antigenpräsentierende Zellen**

Zur Induktion einer Immunantwort ist es notwendig, dass Antigene von spezialisierten Zellen, in ihrer Gesamtheit als Antigenpräsentierende Zellen (APC) bezeichnet, präsentiert werden. Zu ihnen gehören neben den Dendritischen Zellen (DC) unter anderem Kupfer-Sternzellen in der Leber, Alveolarmakrophagen in den Alveolen, Mikroglia im Gehirn, sowie Monozyten und Makrophagen [Schiebler et al., 1997]. Die Besonderheit der APC liegt darin, dass sie als einzige Zellen exogene Antigene aufnehmen und dem Immunsystem über MHC II präsentieren können [Abbas et Lichtman, 2003].

APC nehmen exogene Antigene auf und präsentieren Fragmente über MHC II, so dass die Epitope Lymphozyten angeboten werden können. Von außen aufgenommene Proteine

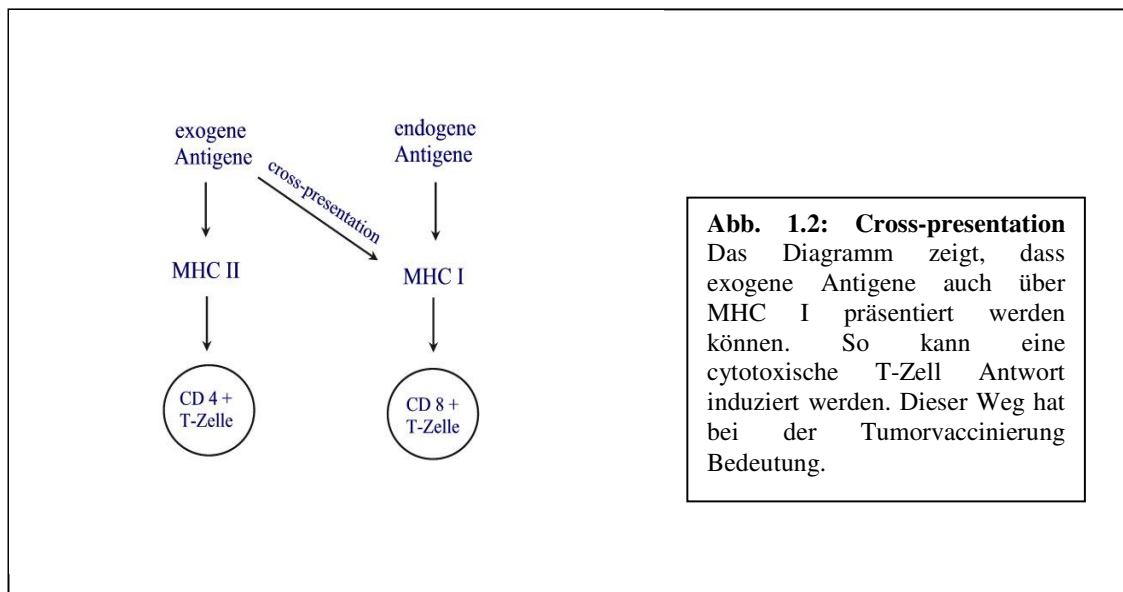
---

werden in Peptide von ca. 12-16 Aminosäuren zerlegt. Die Epitope werden an die Zellmembran transportiert und zusammen mit MHC Molekülen der Klasse II präsentiert. Solche Komplexe werden von CD4+ T-Lymphozyten erkannt. Diese stimulieren B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern. [Hof et al., 2000].

Mit Antigen konfrontierte APC führen beim Individuum in der Regel zu einer Th1 dominierten CD4+ T-Zell Antwort. Das Zytokinmuster ist dabei durch IL-1, IL-2, IL-12 und IFN- $\gamma$  dominiert. Wenn die Reifung der APC blockiert wird, kommt es zu einer humoralen Th-2 Antwort, bei der die Zytokine IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 vorherrschen. Es entsteht eine ineffektive Immunantwort, die durch IgE gekennzeichnet ist. Dieser Mechanismus ist bei der Entstehung von Allergien von Bedeutung [Steinman et Pope, 2002].

Endogene Antigene von Viren oder intrazellulären Bakterien benötigen für den direkten Kontakt mit zytotoxischen T-Zellen keine APC. Ist eine Zelle infiziert, so präsentiert sie Antigene über MHC Moleküle der Klasse I. Die endogenen Antigene werden in Proteasomen in Epitope von etwa 10 Aminosäuren zerlegt und intrazellulär an MHC Moleküle der Klasse I gekoppelt. Die MHC Moleküle der Klasse I werden an die Oberfläche transportiert, wo sie CD8+ T-Lymphozyten präsentiert werden können. Diese können direkte zytotoxische Funktion gegen infizierte Zellen haben. Für die Induktion dieser Immunantwort gegen ein dem Körper nicht bekanntes Antigen sind dennoch APC notwendig [Abbas et Lichtman, 2003].

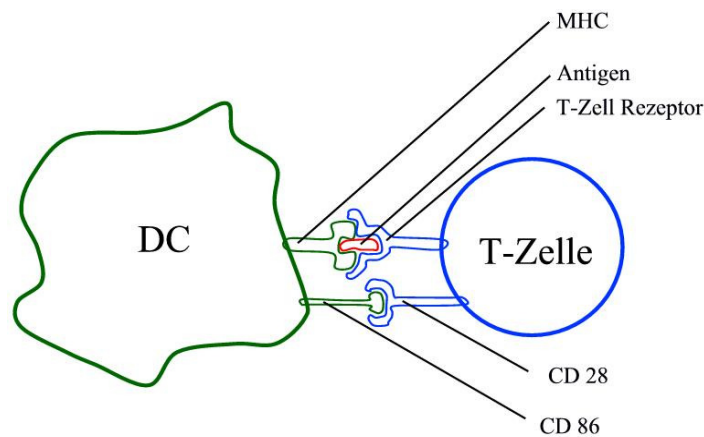
Neben der „klassischen“ Antigenpräsentation bei der exogene Antigene über MHC II an CD4+ T-Zellen und endogene Antigene über MHC I an CD8+ T-Zellen präsentiert werden, ist in den letzten Jahren die „cross-presentation“ diskutiert worden. Hierbei werden exogene Antigene von DC über MHC I an CD8+ T-Zellen präsentiert. Diese Route ist besonders bei der Immunität gegenüber Infektionen wichtig. Bei der Vakzinierung gegen Infektionen und Tumore stellt die „cross-presentation“ einen interessanten Ansatzpunkt dar, weil auf diesem Weg eine cytotoxische T-Zell Reaktion gegen exogene Antigene induziert werden kann [Steinman et Pope, 2002].



### 1.3.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind als klassische APC effektive Stimulatoren von naiven T-Zellen. Die weit ausgestreckten Fortsätze erinnern an Nervenzellen und sind für ihre Namensgebung verantwortlich [Banchereau et Steinman, 1998]. Bei DC ist die Phagozytoseleistung gegenüber großen Partikeln wie z.B. Bakterien geringer ausgeprägt als bei Makrophagen. Trotzdem können sie Antigene sehr effektiv aufnehmen und an der Zelloberfläche präsentieren. Sie sind in Antigenaufnahme, Antigenprozessierung, Migration und T-Zell Stimulierung anderen APC überlegen [Romani et al., 2001].

Um eine Immunantwort zu induzieren, sind beim Kontakt von APC und T-Zelle zwei Signale notwendig. Als Signal 1 wird die Interaktion zwischen MHC und T-Zell Rezeptor bezeichnet. Signal 2 wird als costimulatorisches Signal bezeichnet. Es besteht auf Seite der APC aus CD 80 und CD 86 und auf Seite der T-Zellen aus CD 28 [Abbas et Lichtman, 2003].



**Abb 1.3: Antigenpräsentation einer DC an eine T-Zelle** - Für eine Induktion einer Immunantwort sind zwei Signale notwendig. Signal 1 besteht aus der Interaktion von MHC, Antigen und T-Zell Rezeptor. Das costimulatorische Signal 2 besteht aus CD 86 und CD 28.

DC sind für eine effektive T-Zell Antwort notwendig und bringen exogene Antigene zu den sekundären lymphatischen Organen wie Lymphknoten und Milz. Sie fungieren als Bindeglied zwischen Antigen und Lymphozyt [Banchereau et Steinman, 1998]. DC haben bei exogenen Antigenen eine entscheidende Rolle als „natural adjuvant“ [Martín-Fontecha et al. 2003]. In vitro oder in vivo sind nur wenige DC notwendig um eine starke T-Zell Antwort zu erreichen. In Zellkultur können DC eine „mixed leukocyte reaktion“ (MLR) auslösen. Dabei werden Leukozyten von einem Individuum, dem Donator, mit T-Zellen von einem anderen Individuum, dem Empfänger zusammengegeben. Wenn beide Individuen unterschiedliche MHC Eigenschaften besitzen beginnen die T-Zellen klonal zu expandieren, was als allogene Reaktion bezeichnet wird. Dabei reicht eine einzige DC aus, um bis zu 3000 T-Zellen zu aktivieren. DC haben also eine entscheidende Rolle bei der Auslösung einer Immunantwort [Banchereau et Steinman, 1998].

DC können auf verschiedenen Wegen entstehen. In vitro können sie sowohl aus CD34+ hämatopoetischen Stammzellen als auch von CD 14+ Monozyten gewonnen werden. Beide

---

werden dazu mit GM-CSF und IL-4 inkubiert. Diese Zellen sind den primären DC funktionell und in ihren Oberflächenmarkern sehr ähnlich [Banchereau et Steinman, 1998].

### **1.3.2 Reifung von Dendritischen Zellen**

DC können sowohl als unreife (immature), als auch als gereifte (mature) Zellen vorliegen. Dabei üben sie je nach Zustand völlig unterschiedliche Funktionen aus. Die meisten DC in den peripheren Geweben liegen im unreifen Phänotyp vor. Nach der Aufnahme von Antigenen oder dem Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen enddifferenzieren sich die unreifen DC in reife Zellen, die eine reduzierte Kapazität in der Antigenaufnahme haben, dafür aber ein außerordentliches Potential zur Antigenpräsentation besitzen [Mellman et Steinman, 2001].

Unreife DC besiedeln verschiedene Organe, sind aber in diesem Stadium kaum in der Lage T-Zellen zu stimulieren. Es wird diskutiert, dass sie T-Zellen in eine Anergie treiben können [Abbas et Lichtman, 2003]. Unreife DC sind optimal für die Aufnahme und das Prozessieren von Antigenen ausgestattet. So werden Mikroben mittels Phagozytose aufgenommen, extrazelluläre Flüssigkeiten durch Makropinozytose. Außerdem wirken zahlreiche Rezeptoren bei der Antigenaufnahme mit. Auf diese Weise können DC Antigene schon in pico- oder nanomolarer Konzentration aufnehmen und prozessieren. Bei anderen APC ist hierzu eine mikromolare Konzentration notwendig. Die Fähigkeit zur Antigenaufnahme verlieren die Zellen jedoch umgehend, wenn sie in einen Reifungsprozess eintreten [Banchereau et Steinman, 1998].

Die Reifung der DC ist für das Erlangen von Immunität von entscheidender Bedeutung. Sie bestimmt darüber, ob ein Antigen eine Immunantwort hervorruft. Nicht nur bei der Reaktion auf Infektionen, sondern auch bei der Kontaktallergie und Autoimmunität ist die Reifung der DC der Schritt, der über die Immunantwort entscheidet [Steinman et Pope, 2002].

Dabei spielen Produkte von Mikroorganismen und Entzündungsmediatoren eine wichtige Rolle. So sind Lipopolysaccharide (LPS), aus denen die Zellwände gram-negativer

---

Bakterien bestehen, IL-1, TNF- $\alpha$  und GM-CSF als Adjuvants stimulierende Faktoren für die Reifung der DC. Eine Aktivierung von CD 40, einem Rezeptor der TNF $\alpha$ -Familie, von IL-1 Rezeptoren oder Toll-like-Rezeptoren führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B der reife DC kennzeichnet. Keratinozyten können, wenn sie geschädigt werden, diese Mediatoren freisetzen [Randolph, 2001].

Die Reifung der DC ist von einer cytoplasmatischen Reorganisation begleitet. Zentral ist dabei die Redistribution von MHC II Molekülen, von intrazellulären Kompartimenten zur Plasmamembran. MHC II nimmt an der Zelloberfläche um den Faktor 5 bis 20 zu, wobei es aber nur zu einer leichten Zunahme der entsprechenden mRNA kommt. Man geht daher im Wesentlichen von einem posttranslationalen Geschehen aus. Begleitet wird die Reifung durch eine massive Hochregulation der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. CD 86 wird um den Faktor 100 hochreguliert. [Mellman et Steinman, 2001]. Auch die Oberflächenmarker CD 40, CD 54, und CD 83 werden bei der Differenzierung hochreguliert [Banchereau et Steinman, 1998].

Nach der Aktivierung wandern die DC über die Lymphgefäße in die lymphatischen Organe wie Lymphknoten und Milz, wo sie ihren Reifungsprozess vollenden [Banchereau et Steinman, 1998]. Die mobilen DC bilden eine Brücke zwischen dem Ort der Antigenkonfrontation und dem Ort der T-Zell Aktivierung [Romani et al., 2001]. Auch ohne Anwesenheit von Pathogenen zirkuliert ständig ein Teil der DC im Körper [Banchereau et Steinman, 1998].

### **1.3.3 Toleranz**

DC sind auch bei der Induktion von Toleranz und bei der Verhinderung von Autoimmunität von entscheidender Bedeutung [Steinman et Nussenzweig, 2002]. Dabei wird die zentrale Toleranz, die im Thymus geprägt wird, von der peripheren Toleranz unterschieden, die im übrigen Körper entsteht. Bei der zentralen Toleranz werden selbstreaktive T-Zellen ausgeschaltet. Die periphere Toleranz ist besonders für Umweltantigene wichtig, die nicht den Thymus passieren, sondern über das Bronchialsystem oder den Gastrointestinaltrakt mit dem Körper in Kontakt kommen [Bonifaz et al., 2002].

Bei der peripheren Toleranz spielt der Endozytoserezeptor DEC-205, der auch auf unreifen DC exprimiert wird, eine wichtige Rolle. Er ist besonders in den T-Zell Regionen der peripheren lymphatischen Organe exprimiert und vermittelt eine effektive Prozessierung und Präsentation in vivo. Die Kopplung eines Antigens an einen anti-DEC-205 Antikörper induziert eine solide periphere CD8+ T-Zell Toleranz [Bonifaz et al., 2002].

### 1.3.4 Langerhanszellen

Langerhanszellen (LC) wurden 1868 von Paul Langerhans als Medizinstudent entdeckt und waren die ersten DC, die beschrieben wurden [Romani et al., 2001]. Sie gelten als Prototyp der peripheren DC [Mellman et Steinman, 2001]. LC stammen aus dem Knochenmark und besiedeln die Epidermis gleichmäßig [Fritsch, 1998]. Morphologisch ähneln sie Nervenzellen. Durch die langen cytoplasmatischen Ausläufer bedecken LC über 25 % der Hautoberfläche [Glenn et al., 2000].

LC sind in der HE-Färbung unter dem Lichtmikroskop nicht zu erkennen, können aber mit immunhistochemischen Methoden dargestellt werden. CD 1a ist ein typischer Oberflächenmarker von LC, dagegen wird CD 1b und CD 1c auf Dermalen Dendritischen Zellen exprimiert [Steinmann et Pope, 2002]. Elektronenmikroskopisch sind sie durch hochcharakteristische zytoplasmatische Zellorganellen gekennzeichnet, die auch als Birbeck-Granula bezeichnet werden und bei der Endozytose eine wichtige Rolle spielen [Fritsch, 1998].

LC sind potente Produzenten von Zytokinen und anderen Mediatoren und werden als APC der Epidermis im Zusammenhang mit den Keratinozyten, als „skin-associated-lymphatic-tissue“ (SALT) bezeichnet [Streilein, 1978]. Neben den LC beherbergt die Haut eine weitere Population von DC, die Dermalen Dendritischen Zellen [Romani et al., 2001].

Der Mensch hat etwa  $10^9$  LC als epidermale DC. Diese unreifen Zellen befinden sich über dem Stratum basale der proliferierenden Keratinozyten [Banchereau et Steinman, 1998].



## **1.4 Erkennung von Antigenen durch das angeborene Immunsystem**

Eine zentrale Frage der Immunologie ist, wie das angeborene Immunsystem erkennen kann, welche Antigene eine potentielle Gefahr für den Körper darstellen. Bestimmte molekulare Muster sind in vielen Pathogenen vorhanden, fehlen aber im körpereigenen Gewebe. Zu ihnen gehören Lipoproteine, Peptidoglycane und Lipopolysaccharide (LPS). Die „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP) sind Muster mit dem das angeborene Immunsystem Bakterien und Parasiten über Toll-like-Rezeptoren (TLR) erkennen kann [Krieg, 2001].

Dabei kann die DNA selber als Muster dienen, um eine Immunantwort auszulösen. Es handelt es sich hierbei um eine bestimmte Sequenz von Basenpaaren, die so genannten CpG Motive, die einen immunstimulatorischen Effekt haben. Anhand dieser Sequenzen lassen sich typische Unterschiede im Genom von Bakterien und Wirbeltieren ausmachen. Bei Wirbeltieren sind diese Basensequenzen unterrepräsentiert. Außerdem sind die CpG Sequenzen bei Wirbeltieren methyliert, was ihre immunogene Funktion verhindert [Krieg, 2001].

Die Familie der Toll-like-Rezeptoren befindet sich hauptsächlich auf DC, Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Sie umfasst zur Zeit etwa 13 verschiedene Rezeptoren. Dabei ist TLR-9 für die Erkennung von CpG-Sequenzen in der DNA verantwortlich. TLR-2 ist für die Erkennung von bakteriellen Lipoproteinen und Peptidoglykanen zuständig, wogegen TLR-4 Lipopolysaccharide (LPS) erkennt. DC haben also verschiedene Möglichkeiten Pathogene von harmlosen Substanzen zu unterscheiden. Wird ein Stoff von den PAMP erkannt, so führt dies zur Aktivierung der DC [Krieg, 2001].

## **1.5 MHC-Restriktion bei Antigenpräsentation**

Die genetisch festgelegte Struktur der MHC Moleküle eines Individuums entscheidet darüber, ob ein bestimmtes Peptid-Epitop dem Immunsystem präsentiert werden kann und dieses eine Immunantwort erzeugt [Falk et al., 1991]. Die MHC Moleküle beim Menschen werden auch „human leukocyte antigen“ (HLA) genannt. Sie entsprechen dem H-2 System bei der Maus [Abbas et Lichtman, 2003].

MHC-Moleküle haben eine große interindividuelle Variabilität und besitzen eine ausgeprägte Spezifität für bestimmte Peptidsequenzen. Innerhalb des Peptides sind zwei Aminosäurepositionen für Bindung an definierte MHC-Moleküle verantwortlich. Diese werden als Ankerpositionen bezeichnet. Da die MHC-Moleküle zur Antigenpräsentation notwendig sind, bestimmen die MHC – Gene ob ein Antigen von T-Zellen als fremd erkannt werden kann. Dies ist insbesondere bei der Definition von Peptid-Impfstoffen für die Behandlung von Tumorerkrankungen von zentraler Bedeutung [Abbas et Lichtman, 2003].

## **1.6 Delayed type hypersensitivity**

Die „delayed type hypersensitivity“ (DTH) ist durch die Induktion einer spezifischen T-Zell Antwort charakterisiert [Abbas et Lichtman, 2003]. Sie wird auch als Immunreaktion Typ IV bezeichnet. Dabei ist das allergische Kontaktekzem ein klassisches Beispiel [Jung et Moll, 2003]. Die DTH kann als Modell zur Induktion einer spezifischen Tumorummunisierung verwendet werden [Jäger et al., 2001].

Im Mausmodell ist Fluorescein 5-isothiocyanate (FITC) ein etabliertes Antigen zur Erzeugung einer DTH. So konnte durch Messung der Ohrschwellung gezeigt werden, dass FITC in einer 0,5% Lösung in Aceton / Dibutylphthalate (A/D) eine Hypersensitivitätsreaktion erzeugt, wogegen sich das Lösungsmittel A/D alleine inert verhält [Sato et al., 1998].

## **1.7 Ansätze der Tumervaccinierung**

Bei einigen Tumoren des Menschen werden spontane Regressionen beobachtet. Dies betrifft insbesondere das Maligne Melanom und das Nierenzellkarzinom. Für die Tumorregression werden immunologische Mechanismen verantwortlich gemacht [Jäger et al., 2001]. Bei Patienten mit Malignen Melanom können tumorspezifische cytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden [Abbas et Lichtman, 2003]. Dies hat zur Entwicklung verschiedener Therapieansätze geführt. Dabei unterscheidet man zwischen einer unspezifischen Immunstimulation und der spezifischen Induktion einer Immunität. In Deutschland sind IL-2 und IFN- $\alpha$  für die Therapie von Patienten mit metastasiertem Nierenzellkarzinom als unspezifische Immuntherapie zugelassen [Brinkmann et al., 2002].

Melanomzellen können *in vitro* durch autologe CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten lysiert werden [Jäger et al., 2001]. Strukturen der Tumorzellen werden als fremd erkannt und induzieren eine Immunantwort. Dies könnte zur Therapie dieser Tumore genutzt werden. Das Prinzip dabei ist die Erzeugung von einer tumorspezifischen cytotoxischen T-Zell Antwort. Entscheidend für eine effiziente Immunantwort ist die Prägung der T-Zellen durch DC [Abbas et Lichtman, 2003].

Tumorzellen haben verschiedene Mechanismen einer Immunantwort zu entgehen. So fehlen funktionstüchtige DC in Tumorgeweben [Banchereau et Steinman, 1998]. Die MHC I und MHC II – Expression wird von Tumorzellen oftmals herunterreguliert, so dass sie von T-Zellen nicht erkannt werden können. Auch sind die Tumorzellen in ihren immunologischen Eigenschaften den Ursprungsgeweben oft ähnlich. Die Expression von Antigenen kann dazu in Tumoren reduziert werden. Bei der Inkubation von Tumorzelllinien mit tumorspezifischen Antikörpern oder T-Zellen können Antigen-Verlust-Varianten von Tumorzellen entstehen [Abbas et Lichtman, 2003].

Die Produkte von Tumorzellen können eine Immunantwort unterdrücken. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) wird von vielen Tumoren sezerniert und inhibiert die Proliferation und Funktion von Lymphozyten und Makrophagen [Abbas et Lichtman, 2003].

Zur Induktion einer spezifischen cytotoxischen T-Zell Reaktion kommen bei C57 black 6 Mäusen H-2Kb restringierte Peptide in Frage. Mit einem H-2Kb restringierten Peptid aus dem „Tyrosinase related protein 2“ (TRP-2), konnte eine Immunisierung bei diesem Mausstamm gegen das Maligne Melanom nachgewiesen werden. Das Peptid wurde topisch auf die Haut appliziert. Dazu musste zuvor das Stratum corneum mit Klebeband entfernt werden. Die topische Applikation auf die Epidermis war hierbei effektiver als eine intradermale Injektion [Seo et al., 2000].

Nach epidermaler Applikation von in Liposomen verpacktem TRP-2, konnten im Mausmodell cytotoxische T-Zellen gegen B16 Melanomzellen nachgewiesen werden [Jérôme et al., 2005].

Damit ist dieses Tumorpepid eine mögliche Zielstruktur für die Entwicklung einer Immuntherapie beim Malignen Melanom. Die Applikation über die Haut bietet sich an, da auf diese Weise eine große Zahl von DC und LC Antigenkontakt haben. Dabei ist die DTH Modell für die Induktion einer Immunantwort [Jäger et al., 2001].

Ein Einsatz der transcutanen Tumorummunisierung beim Menschen erscheint jedoch mit Schwierigkeiten verbunden, da das Stratum corneum entfernt werden muss. Wünschenswert wäre eine Methode, bei der das Antigen die LC über die intakte Haut erreicht.

Die Strategie eine Immunität über die Haut zu induzieren, gibt es auch bei der HIV-Infektion. Es konnte am Mausmodell eine spezifische cytotoxische T-Zell Reaktion gegen HIV in Milz und Darmmukosa nachgewiesen werden. Auch hier musste zuvor das Stratum corneum entfernt werden [Belyakov et al., 2004]. Bei der Vaccinierung gegen HIV, das keine natürliche Immunität hervorruft, sind potente Adjuvantien entscheidend für eine protektive Immunisierung [O' Hagan, 2001].

## **1.8 Transcutane Immunisierung mit Liposomen**

In den letzten Jahren hat die transcutane Applikation von Pharmaka an Bedeutung gewonnen. Die Möglichkeiten mittels transcutaner Applikation systemische Wirkspiegel zu erzielen sind jedoch auf wenige Pharmaka begrenzt. Für Fentanyl, Nitroglycerin, Östradiol, Testosteron, Nikotin und Lidocain gibt es etablierte transcutane Applikationsformen [Barry, 2001].

Die menschliche Haut ist eine sehr effektive Barriere, die Chemikalien nur selektiv passieren lässt. Um die menschliche Haut mit Chemikalien zu penetrieren, kommen potentiell drei Wege in Betracht. Sie können erstens über Haarfollikel und die assoziierten Talgdrüsen, zweitens über die Schweißdrüsen oder drittens zwischen den Fortsätzen der Korneozyten die Haut durchdringen. Dabei stellt das Stratum corneum das Haupthindernis für die Penetration dar. Viele wässrige Lösungen diffundieren um den Faktor 1000 schneller in den Kreislauf, wenn das Stratum corneum vorher entfernt wurde [Barry, 2001].

Ein Ansatz Antigene über die Haut zu applizieren, ist die Verwendung von occlusiven Pflastern. Durch Hydratation der Haut können dann Antigene in die Epidermis eindringen [Glenn et al., 2000].

Liposomen sind mikroskopische Vesikel, die sich aus konzentrisch angeordneten Doppelmembranen zusammensetzen. Einige Medikamente können mit ihrer Hilfe effektiv appliziert werden. Es gibt für Vitamin A, Glukokortikoide und Lidocain etablierte Medikamente, bei denen Liposomen die Penetration der Haut unterstützen [Verma et al., 2003a].

Eine neue Art von Liposomen, die Invasomen genannt wird, erlaubt es Cyclosporin A transcutan zu applizieren. Mit dieser Formulierung können größere Mengen des Wirkstoffes in die Haut transportiert werden, als dies mit herkömmlichen Liposomen möglich ist [Verma, 2002]. Die Möglichkeit Cyclosporin A topisch zu applizieren eröffnet therapeutische Optionen bei zahlreichen Hauterkrankungen. Psoriasis, atopische Dermatitis und das allergische Kontaktekzem sind Krankheiten bei denen eine topische Therapie mit Cyclosporin sinnvoll erscheint. An einem DEBR-Rattenmodell für Alopecia areata konnte gezeigt werden, dass die topische Applikation von Invasomen mit Cyclosporin A Haarwuchs induziert. Gerade die Tatsache, dass keine systemische Zirkulation von Cyclosporin A feststellbar war, macht die Applikation mit Liposomen interessant [Verma, 2002].

## **1.9 Ziel der Arbeit**

Die Untersuchungen von Liposomen bei der Applikation von Pharmaka zur Immunsuppression [Verma, 2002] werfen die Frage auf, ob sich Liposomen auch zur transcutanen Vaccinierung nutzen lassen. Mit ihnen könnte das Stratum corneum passiert werden und das Antigen die APC erreichen. So könnte auf das mechanische Entfernen des Stratum corneums verzichtet werden.

Die Fragestellung der Arbeit ist, ob mit Liposomen die LC der Epidermis erreicht und aktiviert werden können. Dabei sollen verschiedene Formulierungen verglichen werden. Es

soll beurteilt werden, ob die Invasomen, die bei der Applikation von Cyclosporin A erfolgreich sind, sich auch zur Applikation von Antigenen eignen, so dass eine Immunantwort induziert werden kann.

Die LC können dazu auf verschiedenen Ebenen untersucht werden. Einerseits muss geprüft werden wie die LC auf Liposomen in der Epidermis reagieren. Des weiteren ist von Interesse, wie die Liposomen die Leukozytenpopulation in den dränierenden Lymphknoten beeinflussen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Mäuse

C57 Black 6

Harlan Winkelmann, Borcheln

Es wurden männliche und weibliche Mäuse im Alter von 8 bis 12 Wochen für die Experimente verwendet.

#### 2.1.2 Antikörper gegen Mausantigene

Antigen	Isotyp	Klon	Spezies	Monoklonal (m) Polyklonal (p)	Markierung	Hersteller
anti – CD 86 (B7-2)	IgG2a, $\kappa$	GL1	Ratte	m	unmarkiert	Pharmingen, Heidelberg
anti - CD 86 (B7-2)	IgG2a, $\kappa$	GL1	Ratte	m	PE	Pharmingen, Heidelberg
anti – H-2IA (MHC II)	IgG2b	P 7/7	Ratte	m	unmarkiert	Serotec, Düsseldorf
anti – H-2IA <sup>b</sup> (MHCII)	IgG2a, $\kappa$	AF 6- 120.1	Maus	m	FITC	Pharmingen, Heidelberg
Isotypkontrolle	IgG2a	LO- DNP-16	Ratte	m	unmarkiert	Serotec, Düsseldorf
Isotypkontrolle	IgG2a, $\kappa$	MRC OX-34	Maus	m	FITC	Pharmingen, Heidelberg
Isotypkontrolle	IgG2a, $\kappa$	R35-95	Ratte	m	PE	Pharmingen, Heidelberg
anti – Ratte	IgG	-	Kaninchen	p	biotinyliert	DAKO, Hamburg
anti – Ratte	IgG	-	Kaninchen	p	unmarkiert	DAKO, Hamburg
anti – alkalische Phosphatase	IgG1, $\kappa$	-	Ratte	m	Alkalische Phosphatase	DAKO, Hamburg
anti - CD 16 / CD 32	IgG2b	2.4G2	Ratte	m	unmarkiert	Udo Kummer, GSF, München

### 2.1.3 Substanzen und Materialien

β-Mercaptoethanol	Gibco BRL, Karlsruhe
24-Well Platte aus acetonfestem Kunststoff	Technische Werkstätten des Klinikums der Philipps- Universität Marburg
24-Well Platten	Nunc, Nidderau
3-sn-Lysophosphatidylcholin	Fluka, München
3-sn-Phosphatidylcholin	Fluka, München
6-Well Platten	Nunc, Nidderau
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe
Albumin Fraktion V Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumthiocyanate	SIGMA, Taufkirchen
Aquatex, wässriges Eindeckmittel	Merck, Darmstadt
Baktolin Waschlotion	Bode Chemie, Hamburg
Biotin Blocking System (Avidin / Biotin)	DAKO, Hamburg
DAB-Cromogen (3,3'- diaminobenzidine tetrahydrochlorid)	DAKO, Hamburg
Deckgläser	Menzel-Glaser, Portsmouth
Dibutylphthalate	SIGMA, Taufkirchen
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	SIGMA, Taufkirchen
FAST-RED Substrate-System	DAKO, Hamburg
Fetal Bovine Serum (FCS)	BIO-Whittaker Europe, Apen
Fluorescein 5-isothiocyanate (FITC)	SIGMA, Taufkirchen
HBSS-Lösung (Hanks' balanced salt solution)	Gibco BRL, Karlsruhe



---

Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth, Karlsruhe
Kanülen, Microlance 3, 27G	Becton Dickinson, Heidelberg
Ketamin Curamed Wirkstoff: Ketaminhydrochlorid 50 mg/ml	Curamed, Karlsruhe
Levamisol	DAKO, Hamburg
L-Glutamine	BIO-Whittaker Europe, Apen
Mayers Haemalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
NaN <sub>3</sub>	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumpyruvat	Gibco BRL, Karlsruhe
Non-Essential Amino Acids	Gibco BRL, Karlsruhe
Objektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Pap Pen (Wachsstift)	Immunotech, Frankreich
Penicillin-Streptomycin (PEN-STREP)	BIO-Whittaker Europe, Belgium
Petrischalen (94 /16mm)	Greiner, Solingen
Phospholipon 100 ethanolische Lösung 25% (w/w)	Nattermann, Köln
Phospholipon 80 Phosphatidylcholin: 73-79%, Lysophosphatidylcholin bis 6%, Ethanol 25%	Nattermann, Köln
Polycarbonatmembranen 400, 200, 100 und 50 nm	Osmonics, USA
Poly-L-Lysine	Biochrom, Berlin
Rompun Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid 20 mg/ml	Bayer, Leverkusen

---

RPMI 1640	BIO-Whittaker Europe, Apen
Salzsäure (HCl) 1mol/l	Merck, Darmstadt
Skalpelle	Feather – PfM, Köln
Spritzen, 1ml	Becton Dickinson, Heidelberg
StreptABComplex/HRP (horseradish peroxidase)	DAKO, Hamburg
Tris ( $C_4H_{11}NO_3$ )	Carl Roth, Karlsruhe
Trypan blue	SIGMA, Taufkirchen
Wasserstoffperoxid	Carl Roth, Karlsruhe

#### 2.1.4 Geräte

Auflichtmikroskop	Leica, Wetzlar
Brutschrank Cytoperm	Heraeus, Hanau
Eppendorf-Pipette, 10-100 $\mu$ l	Eppendorf, Hamburg
FACS-Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Finnpipetten, 0,5-10 $\mu$ l, 40-200 $\mu$ l, 200-1000 $\mu$ l	Labsystem, Helsinki
Fluoreszenzmikroskop	Leitz, Wetzlar
Handzähler	neoLab, Heidelberg
Kühlzentrifuge Multifuge 3	Heraeus, Hanau
Lupenleuchte	neoLab, Heidelberg
Magnetrührer	Ikamag, USA
MilliQ10-Anlage	Millipore, Eschborn
Neubauer Zellzählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Objektmikrometer	Leitz, Wetzlar

Okularraster	Leitz, Wetzlar
Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Köttermann, Uetze/Hänigsen
Wippschüttler	neoLab, Heidelberg
Zytozentrifuge	Shandon, Frankfurt

## 2.1.5 Puffer und Medien

### 2.1.5.1 PBS-Puffer

Um PBS-Puffer herzustellen wurden folgende Salze in 5 Liter Millipore Wasser unter Rühren gelöst:

Substanz	Menge (g)	Molekulargewicht	Endkonzentration (mM)
KCl	1	74,56	2,68
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2	136,09	0,29
NaCl	40	58,44	136,9
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,2	177,99	8,09

Anschließend wurde der Puffer mit 1M HCl auf pH 7,4 eingestellt.

### 2.1.5.2 FACS-Waschpuffer

Um FACS-Waschpuffer herzustellen wurden einer 500 ml Flasche PBS 5 g BSA und 0,5 g NaN<sub>3</sub> zugesetzt und unter Rühren gelöst. Dadurch entstand eine PBS-Lösung mit 1 % BSA und 0,1 % NaN<sub>3</sub>.

### 2.1.5.3 TBS-Puffer

Um TBS-Puffer herzustellen wurden folgende Salze in 2 Liter Millipore Wasser unter Rühren gelöst:

Substanz	Menge (g)	Molekulargewicht	Endkonzentration (mM)
TRIS (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	2,4	121,14	9,9
NaCl	17,6	58,44	150,6

Anschließend wurde der Puffer mit 1M HCl auf pH 7,5 eingestellt.

#### 2.1.5.4 Komplettes Zellkulturmedium

Zur Kultur von Zellen wurden dem Medium RPMI 1640 weitere Zusätze steril zugesetzt.

Zu einer 500 ml Flasche wurden folgende Substanzen gegeben:

Substanz	Menge (ml)	Ausgangskonzentration	Endkonzentration
L-Glutamine	5	200 mM	2 mM
Natriumpyruvat	5	100 mM	1 mM
Non Essential Amino Acids	5	100 x	1 x
β-Mercaptoethanol	0,5	50 mM	50 μM
PEN-STREP	5	10 000 U / ml	100 U / ml
FCS	50	100 %	10 %

#### 2.1.6 Liposomen

Die bei der vorliegenden Arbeit verwendeten Liposomen wurden von der Liposomenabteilung der Vectron Therapeutics AG hergestellt. Dabei wurden vier verschiedene Liposomenformulierungen am Mausmodell getestet. Sie wurden nach folgenden Rezepturen angefertigt:

##### 2.1.6.1 Invasomen (PL 80-Liposomen)

178 mg Phospholipon 80 wurden in einen 5 ml Messkolben gefüllt. Dazu kamen 845 μl PBS, das tropfenweise unter Vortexen zugegeben wurde. Die erhaltene Emulsion wurde 5 min stark gevortext und danach 5 min im Ultraschallbad suspendiert. Zur Herstellung einer

Liposomenemulsion gleichmäßiger Größe wurde die Suspension durch Polycarbonatmembranen extrudiert. Dabei wurde sie durch Membranen mit stufenweise kleiner werdender Porengröße gepresst. Die Liposomen wurden bei Porengrößen von 400 nm, 200 nm, 100 nm und 50 nm jeweils 21 mal extrudiert.

#### **2.1.6.2 PL100-Liposomen**

Diese Liposomen wurden nach der gleichen Rezeptur wie die Invasomen hergestellt. Als Ausgangssubstanz wurden 135 mg Phospholipon 100 verwendet.

#### **2.1.6.3 Lecithin-Liposomen**

1200 µl Phosphatidylcholin wurden in einen 50 ml Rundkolben gefüllt und im Wasserbad bei 34°C unter Vakuum an einem Rotationsverdampfer eingedampft, bis ein Phospholipidfilm entstand (ca. 15 min). Das restlich enthaltene Chloroform wurde in einem Vakuumschrank 45 min lang entfernt. Zu dem Phospholipidfilm wurden 44 mg Ethanol gegeben. Die Lösung wurde solange gevortext und im Ultraschallbad beschallt, bis sich alles gelöst hatte. Dazu wurden tropfenweise 845 µl PBS unter Vortexen zugegeben. Die erhaltene Emulsion wurde 5 min stark gevortext und danach 5 min im Ultraschallbad suspendiert. Danach wurde die Suspension mit ca. 20 Glasperlen eine Stunde am Rotationsverdampfer bei 34°C rolliert. Anschließend wurde sie wie unter 2.1.6.1 beschrieben extrudiert

#### **2.1.6.4 Lecithin+Lyso-Lecithin-Liposomen**

Diese Liposomen wurden nach der gleichen Rezeptur wie die Lecithin-Liposomen hergestellt. Allerdings wurden als Ausgangssubstanz 1200 µl Phosphatidylcholin und 800 µl Lysophosphatidylcholin verwendet.

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Applikation von Antigenen**

Um die biologische Wirkung von Liposomen und anderen Antigenen bei topischer Applikation auf die Haut zu testen, wurden diese auf Mäuseohren aufgetragen. Pro Maus wurden 100 µl appliziert, jeweils 25 µl auf die innere und äußere Ohrhälfte des rechten und linken Ohres. Vor jeder Applikation wurden die Ohren zum Entfetten mit 70 % Ethanol abgerieben.

#### **2.2.1.1 Liposomenapplikation unter Narkose**

Um die Applikation der Liposomen zu erleichtern und ein ungestörtes Penetrieren der Haut zu gewährleisten, wurden die Mäuse vor der Gabe von Liposomen narkotisiert. Hierbei wurde eine Kombinationsanästhesie aus dem Injektionsanästhetikum Ketamin sowie aus dem Muskelrelaxans Rompun verwendet. Beide Pharmaka wurden nach Körpergewicht dosiert und intraperitoneal gespritzt. Pro Gramm Maus sind 100 µg Ketamin und 10 µg Rompun appliziert worden. Die Mäuse waren so 20-30 min narkotisiert.

#### **2.2.1.2 Lösungsmittelapplikation**

Als Lösungsmittel wurde eine Mischung von Aceton und Dibutylphthalate im Verhältnis 1:1 verwendet (A/D). Dieses Lösungsmittel wurde bei einigen Versuchen mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluorescein 5-isothiocyanate) als 0,5%ige Lösung versetzt (A/D-FITC). Bei der Applikation von A/D sowie A/D-FITC war eine Narkose der Mäuse nicht erforderlich, da das Lösungsmittel bei manuell gehaltener Maus schnell einzieht.

### **2.2.2 Anfertigung von Epidermal-sheets**

Um eine Aktivierung von epidermalen LC im Mäuseohr nachzuweisen, wurde ein Präparations- und Färbeverfahren entwickelt bei dem die Epidermis von der Dermis abgelöst und fixiert wurde. Anschließend konnte sie immunhistochemisch gefärbt werden.

Die Mäuse wurden mittels cervicaler Dislokation getötet. Anschließend wurden die Ohren mit Skalpell und Baktolin unter der Lupe rasiert, um die Ohrbehaarung zu entfernen und so die spätere Auswertung zu erleichtern.

Die Ohren wurden abgeschnitten und in PBS überführt, um eine Austrocknung zu verhindern. Mit Pinzetten wurde dann das Ohr am Knorpel in eine äußere und eine innere Ohrhälfte geteilt. Optisch lassen sich äußeres und inneres Ohr anhand Farbe und Hautdicke unterscheiden.

Um die Epidermis von der Dermis zu lösen, wurden die Ohrhälften in PBS / 20 mM EDTA bei 37°C in einer 6-Well Platte inkubiert. Dabei wurden verschiedene Inkubationszeiten gewählt. Zu Beginn wurde für 3,5 h inkubiert, dann wurde die Inkubationszeit auf eine Stunde verkürzt. EDTA bindet als Chelatbildner 2-wertige Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ . Dadurch verlieren die Hemidesmosomen ihre Adhärenz. Dies führt dazu, dass sich die Epidermis von der Basalmembran lösen lässt. (Junqueira u. Carneiro, 1996)

Anschließend wurden die Ohrhälften 20 min in PBS bei Raumtemperatur gewaschen. Bei einigen Versuchen wurden, statt der EDTA-Inkubation, die Ohren 20 min in einer 0,5M  $\text{NH}_4\text{SCN}$  / PBS Lösung bei 37°C inkubiert.

Die Epidermis wurde unter der Lupe mit einem stumpfen Skalpell und Pinzette von der Dermis abgetrennt, wieder in PBS überführt und vorsichtig ausgebreitet. Somit ergaben sich pro Maus 4 Epidermal-sheets, die immunhistochemisch gefärbt wurden. Nach der Trennung von der Dermis war nicht mehr erkennbar, ob das Sheet von einem äußeren oder inneren Ohr stammte.

Die Epidermal-sheets wurden anschließend 10 min mit -20°C kaltem Aceton in einer acetontfesten 24-Well Platte fixiert und anschließend wieder in PBS überführt. Die fixierten Epidermal-sheets ließen sich mehrere Tage in PBS bei 4°C aufbewahren.

### **2.2.3 Extravasation von Langerhanszellen aus Mäuseohren**

Um das Migrationsverhalten von LC nach Liposomenapplikation zu untersuchen, wurden die Ohren in Kulturmedium aufgenommen. Dazu wurden die Ohren mit einer 70 %igen Ethanollösung gründlich desinfiziert und dann wie unter 2.2.2 beschrieben präpariert.

Die geteilten Ohrhälften wurden in einer 24-Well Platte mit jeweils 1 ml kompletten Zellkulturmedium pro Well in Kultur genommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Ohren mit der Epidermis nach oben flach ausgebreitet in den Wells schwimmen. Die Ohren wurden dann im Brutschrank inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, relative Luftfeuchtigkeit 90 – 95 %). Die LC wanderten mit der Zeit aus und konnten im Inversmikroskop auf dem Boden der Wells beobachtet werden. Auf die gleiche Art wie die Ohrhälften, wurde auch eine Präparation der Epidermis, sowie die abgetrennte Dermis in Kultur genommen.

### **2.2.4 Ernten der ausgewanderten Langerhanszellen**

Zum Ernten der ausgewanderten Zellen wurden die Ohrhälften, die Epidermal-sheets oder die Dermis mit Pinzetten aus dem Well entfernt. Sie konnten zur weiteren Untersuchung in eine neue 24-Well Platte mit frischem Medium überführt werden. Um die Zellen vom Boden zu lösen, wurde das Medium kräftig aufsuspendiert und in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Anschließend wurden die Wells mit jeweils 1 ml HBSS nachgespült. Um die Zellzahl zu erhöhen wurden immer die Zellen der vier zu einer Maus gehörenden Ohrhälften vereinigt und zusammen weiterverarbeitet und einmal mit HBSS gewaschen.

### **2.2.5 Anfertigung von Cytospins aus Langerhanszellen**

Für die immunhistochemische Beurteilung der ausgewanderten LC wurden Zytozentrifugenpräparate (Cytospins) angefertigt. Dazu wurden die Zellen in 200 µl HBSS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Neubauer Zählkammer in einer 1:1 Verdünnung mit Trypanblau gezählt.

Danach wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension mit der Zytozentrifuge für 7 min bei 700 rpm zentrifugiert. Die fertigen Cytospins wurden über Nacht luftgetrocknet und



anschließend 5 min mit 4°C kaltem Aceton fixiert und direkt immunhistochemisch gefärbt. Bei Bedarf konnten sie nach der Fixierung auch bei –80°C nachgelagert werden. Dann wurden sie ein zweites Mal in 4°C kaltem Aceton fixiert.

### **2.2.6 Anfertigung einer Einzelzellsuspension aus Lymphknoten**

Um Lymphknoten zu gewinnen, wurden die Mäuse mittels cervicaler Dislokation getötet. Danach wurden sie ventral mit einer 70% Ethanollösung desinfiziert und dann das Fell medial von der Mandibula bis zur Symphyse mit einer Schere unter sterilen Bedingungen aufgeschnitten. Die cervicalen und axillären Lymphknoten wurden herauspräpariert und in HBSS aufgenommen.

Eine Einzelzellsuspension wurde hergestellt, indem die Lymphknoten in ein Sieb mit 100 µm Maschenweite überführt und mit dem Stempel einer Spritze durch das Sieb gerieben wurden. Das Sieb hing dabei in einer Petrischale mit HBSS, so dass die durch das Sieb geriebenen Zellen in den Puffer ausgeschwemmt wurden.

Die Zellsuspension wurde kräftig aufsuspendiert und 1-2 mal mit je 5 ml HBSS gewaschen. Dabei wurde auf Eis gearbeitet und in einer Kühlzentrifuge bei 4°C zentrifugiert.

### **2.2.7 FACS-Färbung der Einzelzellsuspension aus Lymphknoten**

Die Zellen wurden in 500 µl einer 10 %igen Lösung von 2.4G2 in FACS-Waschpuffer aufgenommen. In dieser Lösung wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert. 2.4G2 ist ein Antikörper, der spezifisch an Fcγ-Rezeptoren II und III (CD 32 und CD 16) der Zellen bindet und so verhindert, dass der spezifische Antikörper über den Fc-Teil bindet.

0,5 – 1 \* 10<sup>6</sup> Zellen wurden in jeweils 50 µl einer 1:50 verdünnten Antikörperlösung aufgenommen und 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Dabei kamen folgende Antikörper zum Einsatz:

Probe	Antikörper
1	Isotyp-FITC + Isotyp-PE
2	MHCII-FITC
3	CD86-PE
4	MHCII-FITC + CD86-PE

Die Zellsuspension wurde mit FACS-Waschpuffer gewaschen und mit dem FACS-Calibur gemessen. Da tote Zellen eine unspezifische Affinität aufweisen, wurden sie mit Propidiumjodid [ $1\mu\text{g/ml}$  Endkonzentration] ausgegated und nur die lebenden Zellen ausgewertet. Die FACS-Messungen wurden von Herrn Dr. Abdo Konur durchgeführt.

### 2.2.8 Immunhistochemische Färbung der Epidermal-sheets

Für die immunhistochemische Untersuchung der Epidermal-sheets wurde eine Peroxidasefärbung gewählt. Alle Färbeschritte wurden in einer 24-Well Platte bei Raumtemperatur durchgeführt.

Damit die gesamte Oberfläche der Epidermal-sheets mit den Färbereagenzien in Kontakt kam, war ein Volumen von  $200\mu\text{l}$  pro Well notwendig. Auch wurde darauf geachtet, dass die Epidermal-sheets flach ausgebreitet im Well lagen und sich nicht zusammenfalteten. Bei einem gefalteten Epidermal-sheet besteht die Gefahr, dass die Färbereagenzien an bestimmten Stellen nicht ihre Zielstruktur erreichen können. Gegebenenfalls wurden die Sheets mit einer Pinzette wieder entfaltet und flach im Well ausgebreitet.

Optimiert wurde die Inkubation dadurch, dass die 24-Well Platte während der Inkubationszeiten bei allen Block- und Färbeschritten auf einen Wippschüttler gestellt wurde. Zwischen den Färbeschritten wurde jeweils 3 mal mit TBS gewaschen.

### **2.2.8.1 Blocken**

Ein häufiges Problem bei der Immunhistochemie sind unspezifische Hintergrundfärbungen. Um eine spezifische Färbung ohne störenden Background zu erreichen, kamen vor der eigentlichen Färbung mehrere Blockschritte zur Anwendung.

Als Erstes wurden die Epidermal-sheets in einer Lösung von 0,6 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Methanol für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.  $\text{H}_2\text{O}_2$  inaktiviert die endogene Peroxidase und gewährleistet, dass das Substrat nur spezifisch von dem im StreptABComplex befindlichen Enzym umgesetzt wird.

Im zweiten Blockschritt wurde das zelluläre Biotin geblockt. Biotin ist ein Vitamin und Coenzym, das in vielen Geweben vorkommt. Da bei der Peroxidasefärbung ein biotinylierter Zweitantikörper verwendet wird, musste vorher das endogene Biotin geblockt werden. So kann der StreptABComplex nur spezifisch an den biotinylierten Antikörper und nicht an zelluläres Biotin binden.

Avidin bindet mit einer hohen Affinität an Biotin. Zum Blocken wurden die Epidermal-sheets zunächst 10 min mit Avidin inkubiert, das mit dem endogenen Biotin eine Bindung eingeht. Anschließend wurde 10 min mit Biotin geblockt, das an überschüssiges Avidin bindet und so verhindert, dass der biotinylierte Zweitantikörper an das Avidin bindet.

Als dritter Blockschritt wurden die Epidermal-sheets 20 min mit TBS / 1% BSA inkubiert. Das Bovine-Serum-Albumin sättigt potentielle Proteinbindungsstellen ab, so dass sich die Antikörper nicht unspezifisch anlagern können.

### **2.2.8.2 Färbung**

Die Epidermal-sheets wurden zuerst mit einem unmarkierten Primärantikörper (monoklonal, Ratte-anti-Maus) in einer 1:50 Verdünnung 1 h in TBS / 1% BSA inkubiert. Es wurde ein anti-MHC II Antikörper zur Detektion von LC, ein anti-CD86 zum Nachweis der Aktivierung von LC, sowie der Isotyp rIgG2a verwendet.

---

Als Zweitantikörper wurde ein biotinylierter Kaninchen-anti-Ratte Antikörper verwendet. Mit ihm wurden die Epidermal-sheets 45 min in einer 1:200 Verdünnung in TBS / 1% BSA inkubiert. Dieser Antikörper erkennt den von der Ratte stammenden Primärantikörper und bindet an ihn.

Als nächstes wurde mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex für 20 min inkubiert. Der Enzymkomplex besteht zum einen aus Streptavidin, zum anderen aus einer biotinylierten Peroxidase. 30 min vor der Anwendung wurden beide Substanzen zu gleichen Teilen in TBS-Puffer angesetzt. Avidin und Biotin binden mit großer Affinität, und es bildet sich ein Komplex, der zum einen durch Avidin, zum anderen durch die Peroxidase charakterisiert ist. Über das Avidin bindet sich der Komplex an den biotinylierten Zweitantikörper.

Als Substrat wurde DAB-Chromogen verwendet, das sich durch eine tiefbraune Farbe auszeichnet. Das DAB-Substrat [1mg/ml] in TBS wird kurz vor Gebrauch mit 1 µl 30 %iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pro ml Substrat versetzt. Die Epidermal-sheets werden 15 min mit dem DAB-Chromogen inkubiert. Das Substrat wird von der Peroxidase in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert und es entsteht ein braunes unlösliches Endprodukt. Dabei kann die mit der Zeit intensiver werdende Färbung im Auflichtmikroskop beobachtet werden. Nach 15 min wurden die Epidermal-sheets mit Millipore-Wasser gewaschen.

Um die mittels Immunhistochemie spezifisch gefärbten LC besser den morphologischen Strukturen der Epidermis zuordnen zu können, wurden die Zellkerne zusätzlich mit Haemalaun gefärbt. Hierbei wurden die Epidermal-sheets für 2 min mit einer 1:10 verdünnten Haemalaunlösung inkubiert. Anschließend wurden sie gewaschen und 15 min mit Leitungswasser gebläut.

Die fertig gefärbten Epidermal-sheets wurden im Wasserbad mit Hilfe von Pinzetten auf Objektträger aufgezogen und mit Aquatex sowie Deckgläschen eingedeckt.

### **2.2.9 Färben von Epidermal-sheets auf polylysinbeschichteten Objektträgern**

Um die Eigenschaften der Mäuseepidermis näher zu untersuchen, wurde ein weiteres Aufarbeitungsverfahren angewandt. Dabei wurden die Epidermal-sheets nicht in den 24-Well Platten gefärbt, sondern direkt nach der Präparation auf polylysinbeschichtete Objektträger aufgezogen und dann immunhistochemisch ähnlich wie Gefrierschnitte gefärbt.

Die Ohren wurden wie unter 2.2.2 (Material und Methoden) beschrieben präpariert. Dabei wurde zum Ablösen der Epidermis die  $\text{NH}_4\text{SCN}$ -Lösung gewählt. Die präparierten Epidermal-sheets wurden in einer Schale PBS vorsichtig ausgebreitet und mit Pinzetten an die Pufferoberfläche geführt, bis sie sich flach an der Puffer-Luft-Grenze ausbreiteten.

Die Objektträger wurden mit Polylysin beschichtet, indem ein Tropfen der Lösung zwischen zwei Objektträgern zerrieben und dann getrocknet wurde. Dann wurden die Epidermal-sheets mit einem unbehandelten Objektträger vorsichtig von unten aus dem Pufferbad angehoben, und upside-down auf einen polylysinbeschichteten Objektträger gepresst. Die Epidermal-sheets hafteten an der Beschichtung, so dass der erste Objektträger wieder vorsichtig entfernt werden konnte.

Die Präparate wurden luftgetrocknet und konnten anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren werden. Beim Auftauen wurden die Präparate direkt aus dem Gefrierschrank 15 min acetonfixiert. Danach wurden sie analog zur Beschreibung 2.2.8 (Material und Methoden) gegen MHC II, CD86 und den Isotyp gefärbt.

### **2.2.10 APAAP-Färbung der aus Mäuseohren ausgewanderten**

#### **Langerhanszellen auf Cytospins**

Um die mittels Cytospin auf Objektträger gebrachten LC immunhistochemisch zu untersuchen, wurde die APAAP (Alkalische Phosphatase – Anti-Alkalische Phosphatase) Färbung eingesetzt. Die fixierten Zellen wurden mit einem Wachsstift eingekreist, um die Färbereagenzien lokal auf die Zellen zu begrenzen und ein Verlaufen zu verhindern. Pro Objektträger wurden von jedem Färbereagenz 100  $\mu\text{l}$  eingesetzt. Die Antikörper wurden

1:50 in TBS / 1% BSA verdünnt. Die Inkubationen fanden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer statt. Zwischen allen Färbeschritten wurde jeweils 3 x mit TBS gewaschen.

Die Zellen wurden mit TBS / 1% BSA für 30 min geblockt, um potentielle Proteinbindungsstellen abzusättigen. Danach wurde mit dem Primärantikörper Ratte-anti-Maus (MHC II, CD 86 und Isotyp) für eine Stunde inkubiert. Dann wurde als Brückenantikörper mit Kaninchen-anti-Ratte für 30 min inkubiert. Anschließend wurde mit dem Antikörper-Enzym-Komplex (APAAP-Ratte) ebenfalls für 30 min inkubiert. Um eine intensivere Färbung zu erreichen, wurden die Zellen nun noch ein zweites Mal mit dem Brückenantikörper sowie dem APAAP-Komplex für jeweils 15 min inkubiert.

Durch das Enzym Alkalische Phosphatase, das sich am APAAP-Komplex befindet, wurde das für 15 min zugefügte Substrat FAST-RED umgesetzt. Es erzeugt eine leuchtend rote Farbe. Dem Substrat wurde Levamisol [25µM] zugesetzt. Es inhibiert die endogene alkalische Phosphatase und erhöht so die Spezifität der Färbung. Anschließend wurden die Kerne noch für 2 min mit einer 1:10 verdünnten Haemalaunlösung blau gegengefärbt. Dann wurden die Objektträger für 15 min unter fließendem Wasser gebläut und mit Aquatex eingedeckt.

### **2.2.11 FACS-Färbung der aus Mäuseohren ausgewanderten Langerhanszellen**

Die geernteten LC wurden in 100 µl einer 10 %igen Lösung von 2.4G2 aufgenommen und für 10 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen mit einer Neubauer Zählkammer in einer 1:1 Verdünnung mit Trypanblau gezählt. Die Zellen wurden auf zwei Röhrchen aufgeteilt.

Um Zellverluste gering zu halten, wurden jeweils 2 µl anti-MHC II - FITC [ $\approx 1\mu\text{g}$ ] und anti-CD 86-PE [ $\approx 1\mu\text{g}$ ] Antikörper ohne weitere Waschschrte direkt zur Zellsuspension gegeben und für 30 min im Dunkeln inkubiert. Auf die gleiche Art wurde in dem zweiten Röhrchen als Isotypkontrolle jeweils 2 µl mIgG2a-FITC und rIgG2a-PE zu der zweiten

Probe gegeben. Die Zellen wurden gewaschen, in 500 µl FACS-Waschpuffer aufgenommen und am FACS gemessen.

### 2.2.12 Auswertung der Epidermal-sheets

Um an den gefärbten Epidermal-sheets den Aktivierungszustand der LC zu beurteilen, wurden sie mit dem Mikroskop betrachtet. Die LC können ab einer 100 fachen Vergrößerung gut gegeneinander abgegrenzt werden. Anhand der Anzahl und der Intensität der gefärbten Zellen bekommt man einen Eindruck vom Aktivierungszustand der LC.

Um zu dem subjektiven Eindruck ein objektives Beurteilungskriterium für die Aktivierung der LC zu bekommen, wurden die Zellen blind ausgezählt. Dazu wurden die Schriftfelder der Objektträger eines Versuchs mit einem Aufkleber verdeckt, so dass die Beschriftung nicht mehr zu erkennen war. Im Okular des Mikroskops wurde ein Zählraster montiert, das im Gesichtsfeld ein Quadrat zeigt, welches in 10 x 10 Kästchen unterteilt ist. Mit Hilfe eines Objektmikrometers wurde die Fläche des Zählrasters bei verschiedenen Objektiven ausgemessen. Dabei sind folgende Werte ermittelt worden:

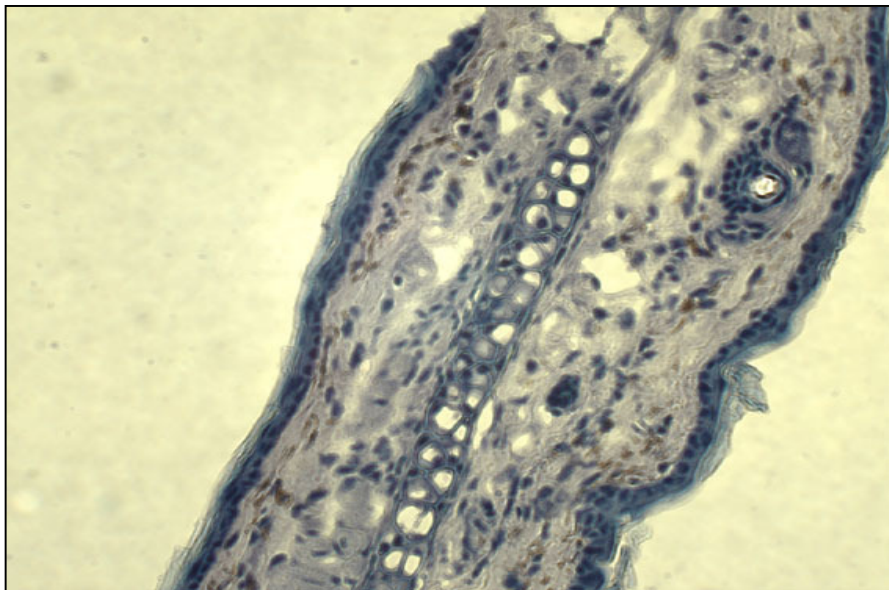
Vergrößerung Objektiv	Kantenlänge des Zählrasters	Fläche des Zählrasters
10 x	1,56 mm	2,434 mm <sup>2</sup>
16 x	0,96 mm	0,922 mm <sup>2</sup>
40 x	0,39 mm	0,152 mm <sup>2</sup>

Da die aktivierten LC zum Teil sehr unregelmäßig auf den Epidermal-sheets verteilt sind, wurde der auszuzählende Bereich ausgewählt, nachdem das Mikroskop unscharf fokussiert wurde. So waren nur noch die Konturen der Epidermal-sheets zu erkennen, nicht aber die einzelnen Zellen. Durch diese Methode konnte ein Gesichtsfeld zufällig bestimmt werden. Die positiven Zellen dieses Rasters wurden nun mit dem Handzähler gezählt. Danach wurde ein neues Gesichtsfeld zufällig bestimmt. So wurden pro Epidermal-sheet 10 Gesichtsfelder ausgezählt. Aus den Zellzahlen wurde das arithmetische Mittel gebildet und auf Quadratmillimeter umgerechnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung von Epidermal-sheets

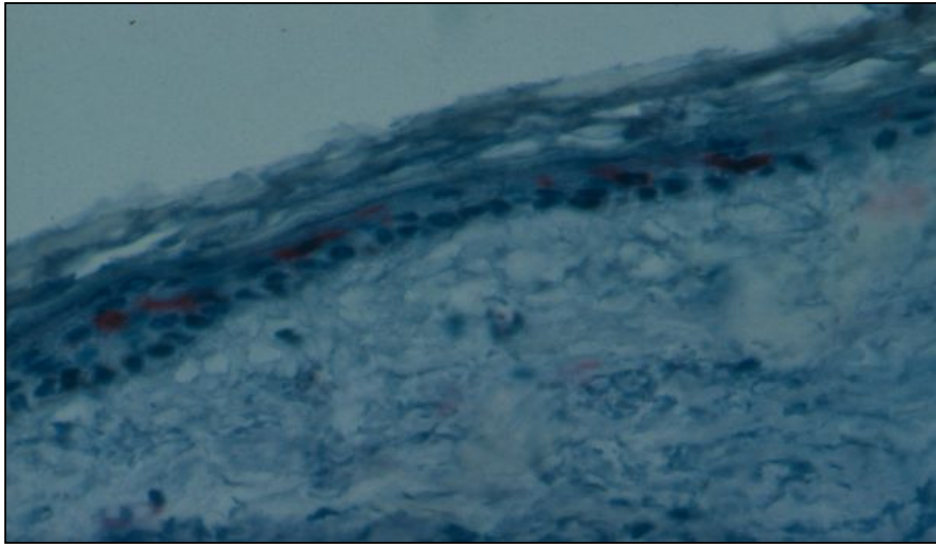
Um den Aktivierungszustand von Langerhanszellen (LC) untersuchen zu können, musste eine Methode entwickelt werden, die die Beurteilung möglichst vieler LC eines Mäuseohres erlaubt. Entscheidend bei der Aufarbeitung eines histologischen Präparates der Haut ist die Methode der Schnittführung. Bei der konventionellen Gefrierschnitttechnik wird ein Querschnitt durch das Mäuseohr dargestellt. Mit dieser Methode können LC immunhistochemisch gefärbt und am Mikroskop beurteilt werden. Allerdings sind auf einem Querschnittspräparat nur sehr wenige LC getroffen und so auswertbar. Auch die Morphologie der LC kann nur schlecht beurteilt werden.



**Abb. 3.1: Gefrierschnitt eines Mäuseohres HE-Färbung –  
Originalvergrößerung 200 x**

Im Querschnitt sind Epidermis und Dermis gut gegeneinander abgrenzbar.  
Zentral ist Ohrknorpel zu erkennen. Die Epidermis ist nur schlecht beurteilbar,  
LC sind in der HE-Färbung nicht zu erkennen.





**Abb. 3.2: Gefrierschnitt humaner Haut mit CD1a-Färbung  
Originalvergrößerung 400 x - Quelle: Abdo Konur**

In der immunhistochemischen Färbung sind in der Epidermis positive Zellen erkennbar. Die Morphologie der Zellen läßt sich jedoch nicht darstellen. Eine Quantifizierung der Zellen in nur einer Ebene nur schwer möglich.

Wegen der geringen Zellzahl ist die Gefrierschnittechnik für die Untersuchung einer großen Zahl von LC also nicht geeignet. Besser geeignet für die Beurteilung von LC ist die Anfertigung von Epidermal-sheets (Material und Methoden 2.2.2). Diese Technik ermöglicht eine Aufsicht auf die Haut und somit die Erfassung und Quantifizierung sämtlicher LC der Epidermis. Dabei handelt es sich um eine Präparation der gesamten Epidermis eines Mäuseohres. Die Epidermis wird mit Aceton fixiert und dann immunhistochemisch in einer 24-Well Platte gefärbt. Mit dieser Methode lassen sich fast sämtliche LC eines Mäuseohres darstellen und beurteilen.

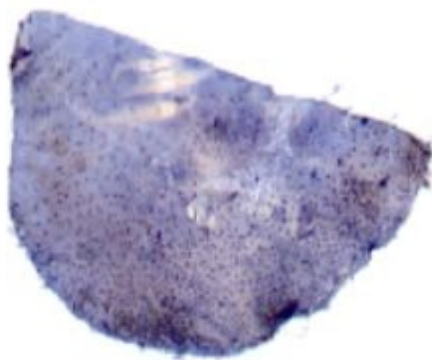
### 3.1.1 Präparation der Epidermis

Um Epidermal-sheets anzufertigen, musste zunächst eine Methode gefunden werden, mit der die Epidermis eines Mäuseohres gut von der Dermis abgelöst werden konnte. Dabei wurden vier Anforderungen an das Verfahren gestellt:

1. Die Epidermis muss sich gut von der Dermis ablösen lassen.
2. Die Epidermis muss in sich stabil bleiben und sich gut weiterverarbeiten lassen.
3. Das Verfahren darf die Oberflächenantigene der LC nicht zerstören.
4. Das Verfahren darf nicht zu einer Aktivierung der LC führen.

Von Aberer wird zur Anfertigung von Epidermal-sheets eine Inkubation der Mäuseohren für 20 min in 0,5M  $\text{NH}_4\text{SCN}$  / PBS bei 37°C beschrieben [Aberer et al., 1986]. Diese Technik wurde von uns getestet und war im Prinzip auch durchführbar. Sie lieferte allerdings selbst nach Fixierung mit Aceton sehr instabile Epidermal-sheets, die schon bei leichter Berührung zerrissen. Auch mit Hilfe einer Lupe war die Präparation nach dieser Methode sehr schwierig und zeitaufwendig.

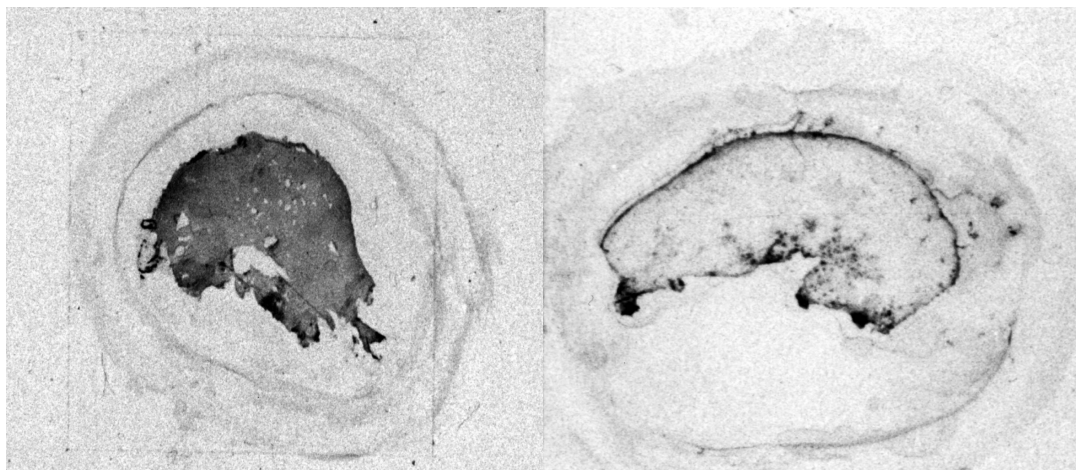
Bessere Resultate lieferte eine Methode bei der die Ohren 1 h in der 20 mM EDTA / PBS Lösung bei 37°C inkubiert und anschließend 20 min bei Raumtemperatur in PBS gewaschen wurden. Die Epidermis ließ sich mit einem stumpfen Skalpel von der Dermis abstreifen und anschließend in PBS ausbreiten. Mit dieser Methode konnte die komplette Epidermis eines Mäuseohres immunhistochemisch gefärbt und auf Objektträger aufgezogen werden (Abb.3.3).



**Abb. 3.3: Epidermal-sheet von einem Mäuseohr:** Die Epidermis wurde nach einer Rasur von dem Ohr abgelöst, fixiert und immunhistochemisch gefärbt. Für einen besseren Kontrast wurde zusätzlich eine Kernfärbung mit Haematoxilin durchgeführt. Im Anschluss wurden die Epidermal-sheets auf Objektträger aufgezogen. Im Mikroskop lassen sich sämtliche LC des Ohres betrachten.

### 3.2 Färben von Epidermal-sheets auf Objektträgern

Eine weitere Methode zur immunhistochemischen Färbung von Epidermal-sheets, war das Aufziehen der Epidermis auf polylysinbeschichtete Objektträger. Die Epidermis wurde auf Objektträger aufgezogen und mit einer Peroxidasefärbung gefärbt. Dabei wurde ähnlich wie bei Gefrierschnitten verfahren. Die Versuche haben gezeigt, dass Epidermal-sheets nur vom Stratum basale aus immunhistochemisch gefärbt werden können. Eine Färbung ist nicht möglich, wenn das Stratum corneum oben liegt. Dies war sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch erkennbar. Da die Epidermis nicht sicher auf die richtige Seite aufgezogen werden konnte, wurde diese Technik aufgegeben und die immunhistochemische Färbung in 24-Well Platten durchgeführt. Die Epidermal-sheets wurden erst nach der Färbung auf Objektträger aufgezogen.



**Abb. 3.4: Epidermal-sheet, gefärbt auf polylysinbeschichteten Objektträgern** - Diese Färbetechnik zeigt, dass eine Färbung der Epidermal-sheets nur vom Stratum basale aus möglich ist. Links wurde der Epidermal-sheet mit dem Stratum corneum nach unten aufgezogen, so dass eine Färbung möglich war. Rechts wurde der Epidermal-sheet mit dem Stratum corneum nach oben auf den Objektträger aufgezogen. Eine Färbung war so nicht möglich.

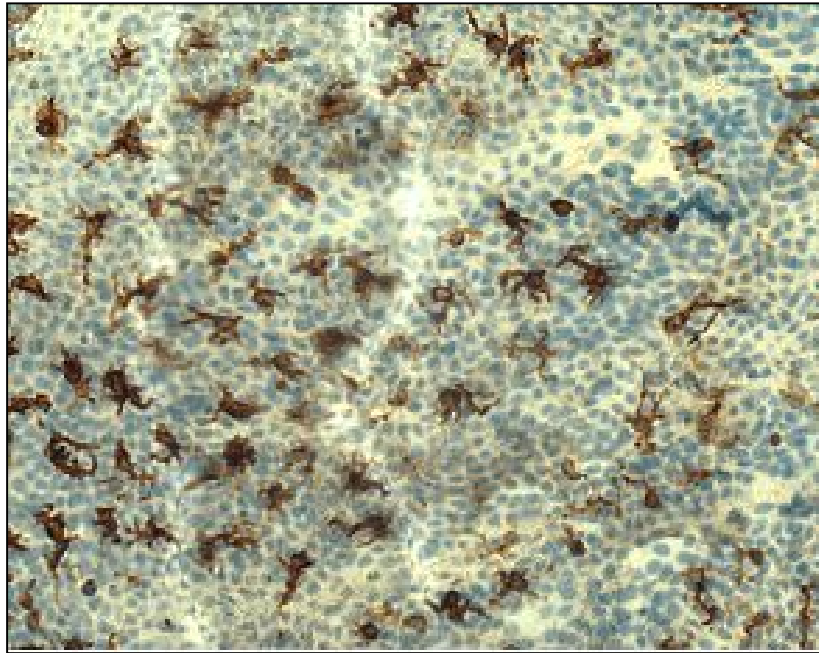
### **3.3 Untersuchung der Verteilung von Langerhanszellen**

Zunächst wurde untersucht wie viele Langerhanszellen (LC) sich auf einem Mäuseohr befinden und wie sie verteilt sind. Da sich beim Mäuseohr eine innere und eine äußere Ohrhälfte unterscheiden lässt, stellte sich die Frage, ob sich die LC gleichmäßig auf beide Ohrhälften verteilen. Um ein objektives Ergebnis zu bekommen, wurden die Epidermal-sheets verblindet ausgezählt.

Um die Verteilung von LC in den Mäuseohren zu untersuchen, wurde immunhistochemisch gegen MHC II gefärbt, das konstitutiv von LC exprimiert wird. Zum einen wurden unbehandelte Mäuse verwendet, deren Ohren nur mit Ethanol abgerieben wurden, zum anderen Mäuse, deren Ohren nach der Ethanolbehandlung für 16 h mit A/D - FITC behandelt wurden.

Bei der Betrachtung mit dem Mikroskop zeigte sich eine relativ gleichmäßige Verteilung der MHC II positiv gefärbten Zellen. Morphologisch waren sie eindeutig als LC zu identifizieren. Nach mehrfachem Auszählen und Wiederholen der Experimente konnte gezeigt werden, dass die Zahl an LC zwischen Innen- und Außenseite der Mäuseohren gleich ist.

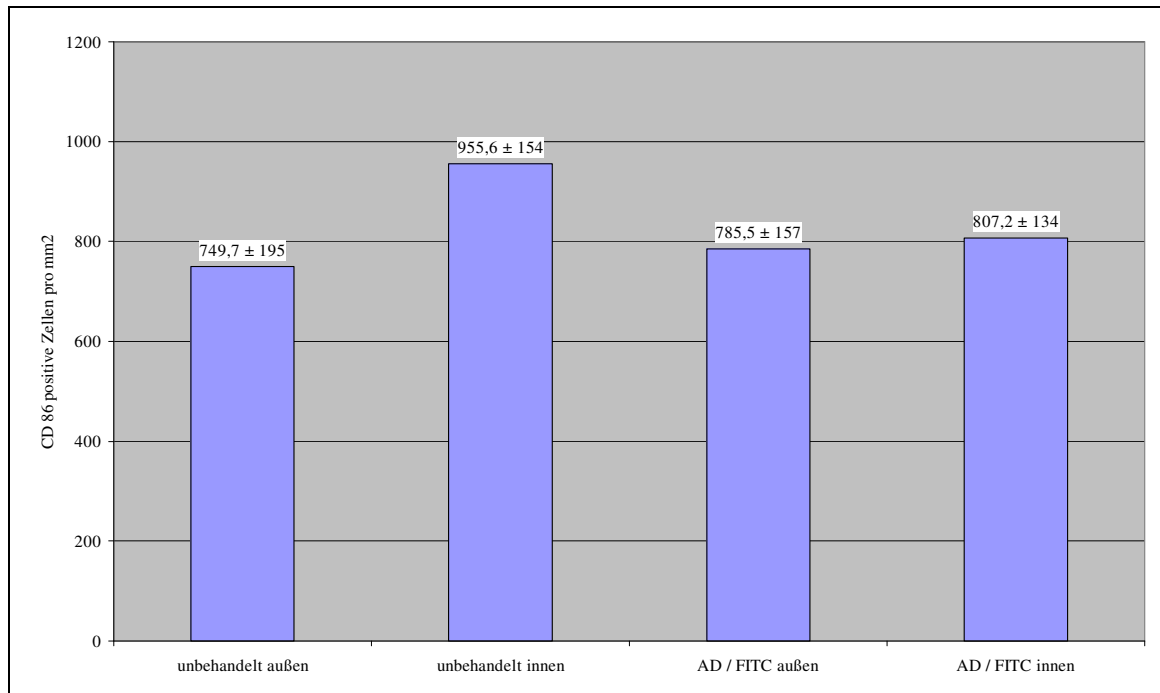
Auch die Applikation von A/D oder A/D - FITC hatte keinen Einfluss auf die Zahl der LC. Ebenso konnte nach Applikation von Liposomen kein Einfluss auf die Zahl der LC nachgewiesen werden. Die Zahl der LC bewegte sich unabhängig von der Behandlung in einem Bereich von etwa 800 Zellen / mm<sup>2</sup>. Auch die Intensität der Färbung konnte nicht durch vorherige Antigenexposition beeinflusst werden. Bei den Färbungen wurden Kontrollen mit einem Isotyp-Antikörper durchgeführt, die negativ ausfielen.



**Abb. 3.5: MHC II-Färbung von Epidermal-sheets (unbehandeltes Mäuseohr)**  
**Originalvergrößerung 200x** – Auf der Abbildung sind die bräunlich gefärbten LC zu erkennen, die weit verzweigte Ausläufer haben. Im Hintergrund sind die mit Haemalaun blau gefärbten Zellkerne der Keratinozyten zu erkennen. Im Durchschnitt befinden sich etwa 800 LC auf einem Quadratmillimeter Mäuseohr. Reproduzierbare Unterschiede zwischen den Ohrseiten konnten nicht nachgewiesen werden. Die Exposition mit Antigenen hat keine Änderung der Zahl der LC zur Folge.

<b>Zählung (n)</b>	<b>unbehandelte Maus</b>				<b>Applikation von AD/FITC für 16 h</b>			
	außen 1	außen 2	innen 1	innen 2	außen 1	außen 2	innen 1	innen 2
<b>1</b>	85	168	135	166	125	94	132	115
<b>2</b>	64	157	167	139	187	83	100	132
<b>3</b>	96	123	124	128	116	116	125	120
<b>4</b>	127	124	131	92	124	116	112	132
<b>5</b>	107	137	142	125	130	85	127	92
<b>6</b>	81	127	128	166	113	119	139	82
<b>7</b>	90	164	130	165	140	113	154	128
<b>8</b>	68	105	136	165	155	130	150	92
<b>9</b>	89	122	153	142	114	114	153	108
<b>10</b>	124	121	190	181	125	89	137	124
<b>Mittelwert n (1-10)</b>	<b>93,1</b>	<b>134,8</b>	<b>143,6</b>	<b>146,9</b>	<b>132,9</b>	<b>105,9</b>	<b>132,9</b>	<b>112,5</b>
<b>LC pro mm<sup>2</sup></b>	<b>612,5</b>	<b>886,8</b>	<b>944,7</b>	<b>966,5</b>	<b>874,3</b>	<b>696,7</b>	<b>874,3</b>	<b>740,1</b>
<b>Mittelwert LC (1-2)</b>	<b>749,7</b>		<b>955,6</b>		<b>785,5</b>		<b>807,2</b>	
<b>1. Standard-abweichung</b>	<b>± 195</b>		<b>± 154</b>		<b>± 157</b>		<b>± 134</b>	

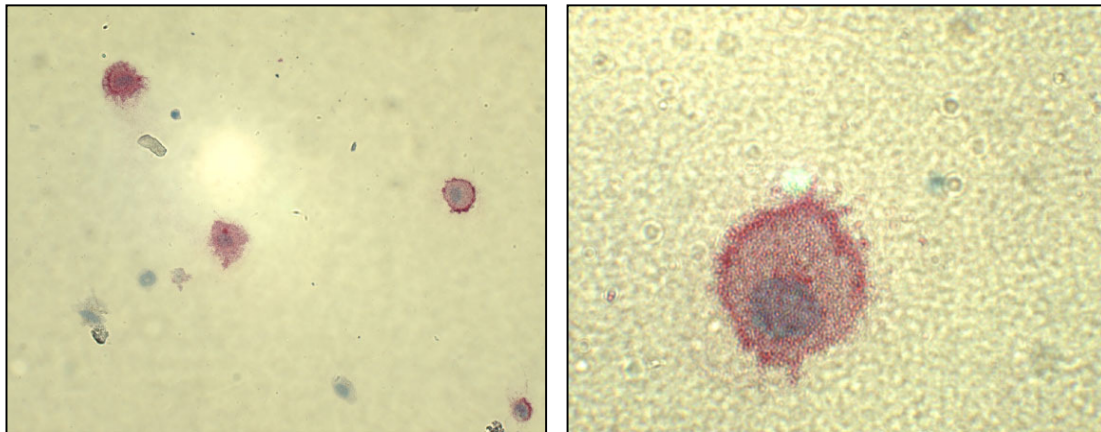
**Tab. 3.1: Anzahl der Langerhanszellen am Mäuseohr**



**Dgr. 3.1: Anzahl der Langerhanszellen am Mäuseohr**

### 3.4 Extravasion von Langerhanszellen in der Zellkultur

Um die Möglichkeiten einer Extravasion der LC aus der Haut zu beurteilen, wurden die Mäuseohren in Zellkulturmedium inkubiert (Material und Methoden 2.2.3). Dabei wurde sowohl die gesamte Ohrhälfte als auch die abgelöste Epidermis verwendet. Mit dem Inversionsmikroskop konnte nach 24 h eine relevante Zahl an Zellen auf dem Boden der Kulturplatte beobachtet werden. Morphologisch zeigten die Zellen zahlreiche dendritische Fortsätze. Bei der immunhistologischen Untersuchung auf Cytospins zeigten die Zellen eine hohe Expression von MHC II und CD 86. Eine zusätzliche Stimulation der Haut mit den Antigenen A/D oder A/D-FITC vor der Inkubation hatte keinen messbaren Einfluss auf die ausgewanderten Zellen. Diese Methode ist daher nicht zur Beurteilung der Einflüsse verschiedener Antigene geeignet.



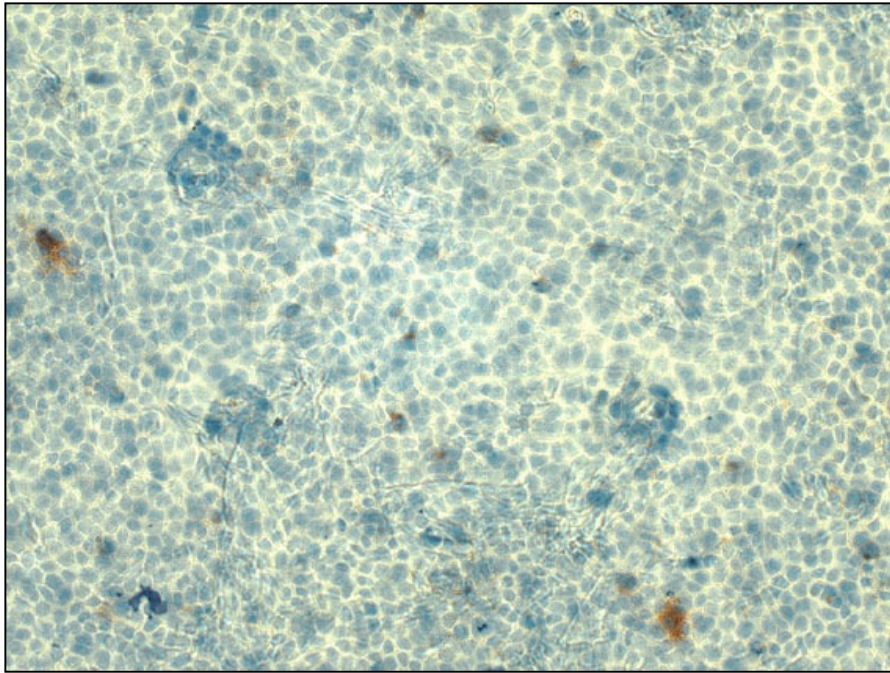
**Abb. 3.6: CD 86 Färbung ausgewanderter LC in Zellkultur - Originalvergrößerung links: 200x, rechts 1000x** – Nach Inkubation der Mäuseohren in Zellkulturmedium lassen sich zahlreiche Zellen auf dem Boden der Kulturplatte beobachten. Sie weisen kleine dendritische Fortsätze auf und sind stark CD 86 positiv.

### 3.5 CD 86 Expression von Langerhanszellen

Um die Aktivierung von LC zu beurteilen, wurden die Epidermal-sheets immunhistochemisch gegen CD 86 gefärbt. Die Aktivierung und Reifung von LC ist durch eine massive Hochregulation von costimulatorischen Molekülen wie CD 80 und CD 86 begleitet (Einleitung 1.3).

Bei unbehandelten Mäusen ist die Zahl der CD 86 positiven Zellen relativ gering, verglichen mit der Färbung gegen MHC II. Es können aber auch hier einzelne CD 86 positive Zellen beobachtet werden. Bei vielen Zellen ließ sich eine sehr schwach positive CD 86 Färbung ausmachen. Sie war teilweise nur schwer von dem unspezifischen Hintergrund zu differenzieren. An bestimmten Stellen trat clusterhaft auch eine größere Zahl von stark CD 86 positiven Zellen auf. In jedem Fall fielen die Isotyp-Kontrollen negativ aus.





**Abb. 3.7:** Immunhistochemische Färbung CD 86 positiver LC im Epidermal-sheet eines unbehandelten Mäuseohres. Originalvergrößerung 200x. – Es sind vereinzelt schwach positiv gefärbte Areale zu erkennen, die sich LC zuordnen lassen.

### 3.6 CD 86 Expression nach Applikation von A/D und FITC

Um eine Aktivierung der LC zu erreichen, wurde sowohl das Lösungsmittel A/D, als auch FITC in einer 0,5% Lösung von A/D auf Mäuseohren appliziert. Vor der Applikation wurden die Ohren mit Ethanol abgerieben. Als Kontrollgruppe dienten Tiere, die nur mit Ethanol behandelt wurden. Nach der Inkubationszeit wurden von den Ohren Epidermal-sheets angefertigt und gegen CD 86 gefärbt.

Insgesamt wies die CD 86 Expression eine relativ hohe Variabilität auf. Die Anzahl der positiv gefärbten Zellen hatte zum Teil eine hohe Schwankungsbreite. Unterschiede gab es sowohl zwischen einzelnen Tieren als auch auf einem Epidermal-sheet. Oft waren einzelne Regionen auf dem Ohr stärker gefärbt als andere. Durch mehrmalige Wiederholung der Versuche ließen sich jedoch folgende Aussagen treffen:

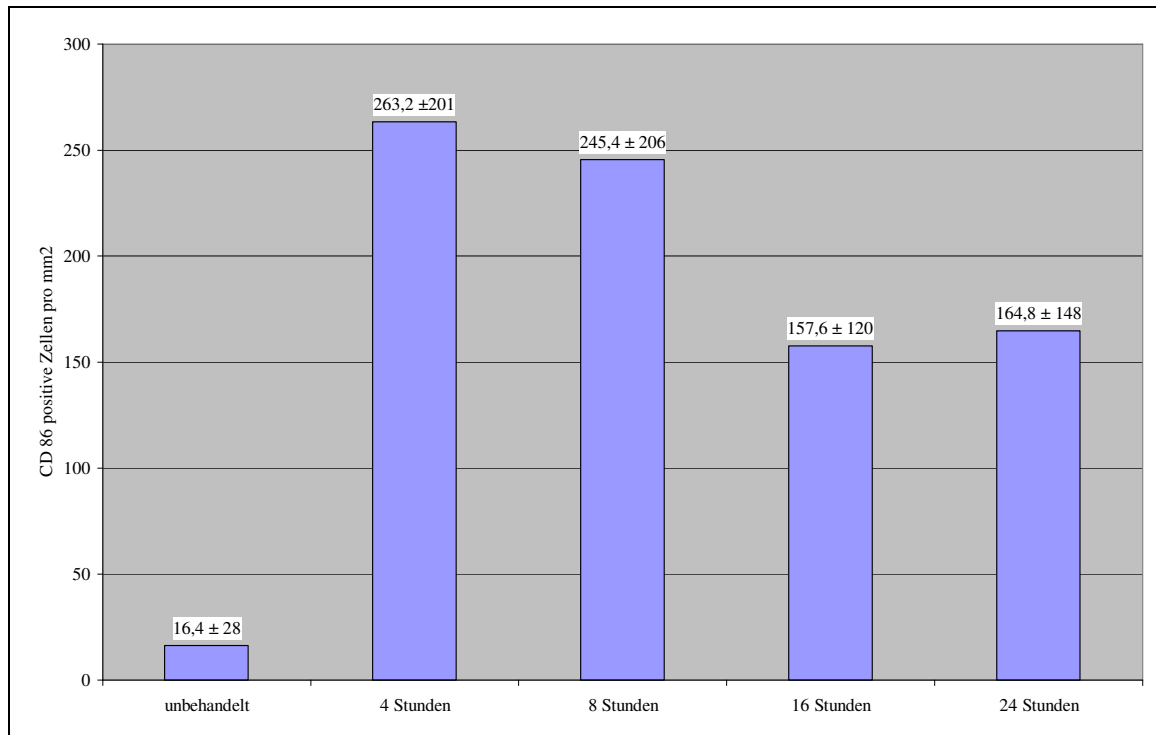


Sowohl A/D - FITC als auch A/D allein führten zu einer verstärkten CD 86 Expression der LC des Mäuseohres. Die Zahl der aktivierten Zellen und die Färbeintensität war bei beiden Substanzen ähnlich. Bei den Färbungen wurden Kontrollen mit dem Isotyp-Antikörper durchgeführt, die negativ ausfielen. Beim Vergleich von äußerer und innerer Ohrhälfte fiel auf, dass nach Applikation am äußeren Ohr in der Regel eine stärkere CD 86 Expression auftrat. Bei den unbehandelten Tieren war dies nicht der Fall.

Bei den Untersuchungen entstand der Eindruck, dass die Inkubationszeit ein wichtiger Faktor für die Stärke der Aktivierung ist. Besonders kurze Inkubationszeiten von 4 Stunden führten zu einer starken CD 86 Expression. Mit zunehmender Inkubationszeit wurde die Zahl der positiven Zellen kleiner. Um dies näher zu untersuchen, wurde eine Zeitkinetik durchgeführt. Dabei wurden Mäusen für 4, 8, 16 und 24 Stunden A/D - FITC appliziert. Anschließend wurden Epidermal-sheets angefertigt und gegen CD 86 gefärbt. Die Epidermal-sheets wurden verblindet an jeweils 10 unterschiedlichen Orten ausgezählt. Die Auszählung zeigte, dass es nach Applikation von A/D – FITC zu einer deutlichen Zunahme von CD 86 positiven Zellen kommt. Nach 4 und 8 Stunden ist die durchschnittliche CD 86 Expression höher als nach 16 und 24 Stunden. Die Messungen weisen jedoch eine hohe Variabilität auf.

<b>Zählung (n)</b>	<b>unbehandelt</b>		<b>4 Stunden</b>		<b>8 Stunden</b>		<b>16 Stunden</b>		<b>24 Stunden</b>	
	außen	innen	außen	innen	außen	innen	außen	innen	außen	innen
<b>1</b>	5	4	94	27	58	1	31	9	25	5
<b>2</b>	0	0	36	17	70	0	36	34	12	0
<b>3</b>	19	3	84	38	60	44	36	1	32	5
<b>4</b>	2	0	43	5	78	0	15	2	55	3
<b>5</b>	2	2	52	7	67	0	34	8	67	7
<b>6</b>	0	5	60	2	57	3	9	29	55	6
<b>7</b>	0	3	98	3	52	50	19	17	13	8
<b>8</b>	0	0	41	5	58	2	22	18	25	29
<b>9</b>	3	0	61	33	73	0	52	23	58	56
<b>10</b>	0	2	74	20	71	2	77	7	40	0
<b>Mittelwert n (1-10)</b>	<b>3,1</b>	<b>1,9</b>	<b>64,3</b>	<b>15,7</b>	<b>64,4</b>	<b>10,2</b>	<b>33,1</b>	<b>14,8</b>	<b>38,2</b>	<b>11,9</b>
<b>CD 86 pos. Zellen / mm<sup>2</sup></b>	<b>16,4</b>		<b>263,2</b>		<b>245,4</b>		<b>157,6</b>		<b>164,8</b>	
<b>1. Standard- abweichung</b>	<b>± 28</b>		<b>± 201</b>		<b>± 206</b>		<b>± 120</b>		<b>± 148</b>	

**Tab. 3.2 CD 86 Expression nach Applikation von A/D - FITC**



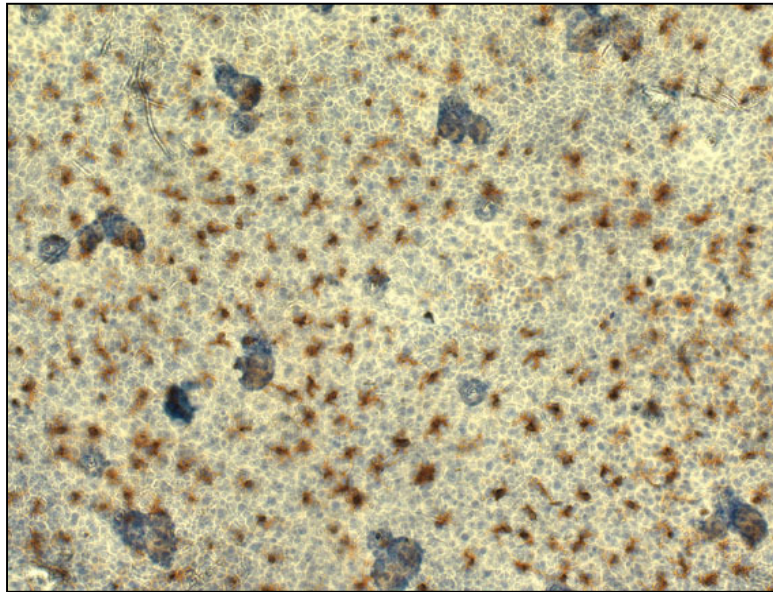
**Dgr. 3.2: CD 86 Expression nach Applikation von A/D - FITC**

### 3.7 CD 86 Expression nach Applikation von Liposomen

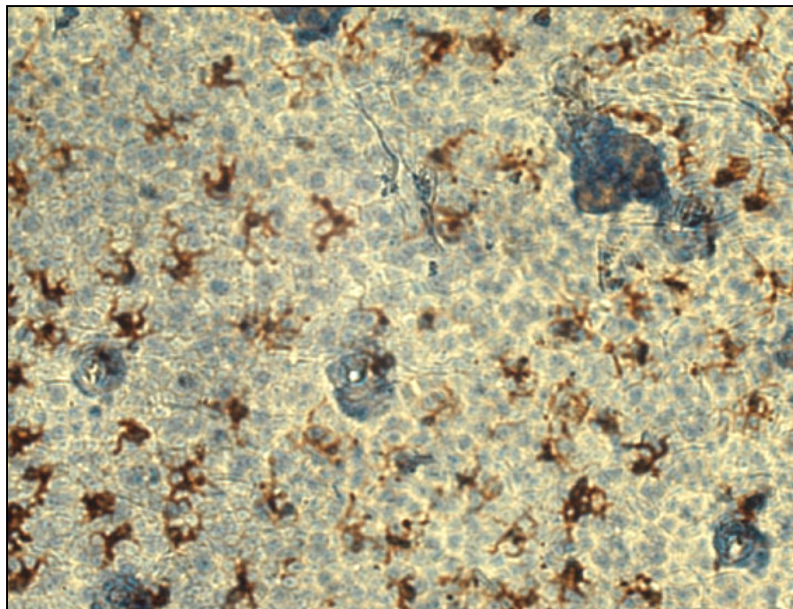
Ein Ziel der vorliegenden Arbeit ist, den Einfluss von Liposomen auf den Aktivierungszustand von LC zu beurteilen. Dabei wurden vier verschiedene Liposomenformulierungen untersucht.

Im Gegensatz zum Lösungsmittel wurde bei der Applikation von Liposomen nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden eine relativ schwache CD 86-Expression erreicht. Bei einer Inkubationszeit von 16 Stunden war die Aktivierung der LC erheblich stärker. Für den Vergleich der verschiedenen Liposomenformulierungen wurde deshalb eine Inkubationszeit von 16 Stunden gewählt.

Die Liposomen induzierten im Vergleich zu dem Lösungsmittel A/D eine relativ starke CD 86 Expression. Unter dem Mikroskop schienen die mit Invasomen behandelten Ohren die stärkste Aktivierung aufzuweisen. Die unbehandelten Ohren waren nur sehr schwach CD 86 positiv gefärbt.



**Abb. 3.8: CD 86 Expression nach Applikation von Invasomen**  
**Originalvergrößerung: 100x** – Es ist eine große Zahl positiv gefärbter LC zu sehen. Im Hintergrund sind die blauen Zellkerne der Keratinozyten zu erkennen. Eine intensivere Blaufärbung zeigen die Haarfollikel, die unregelmäßig verteilt liegen.

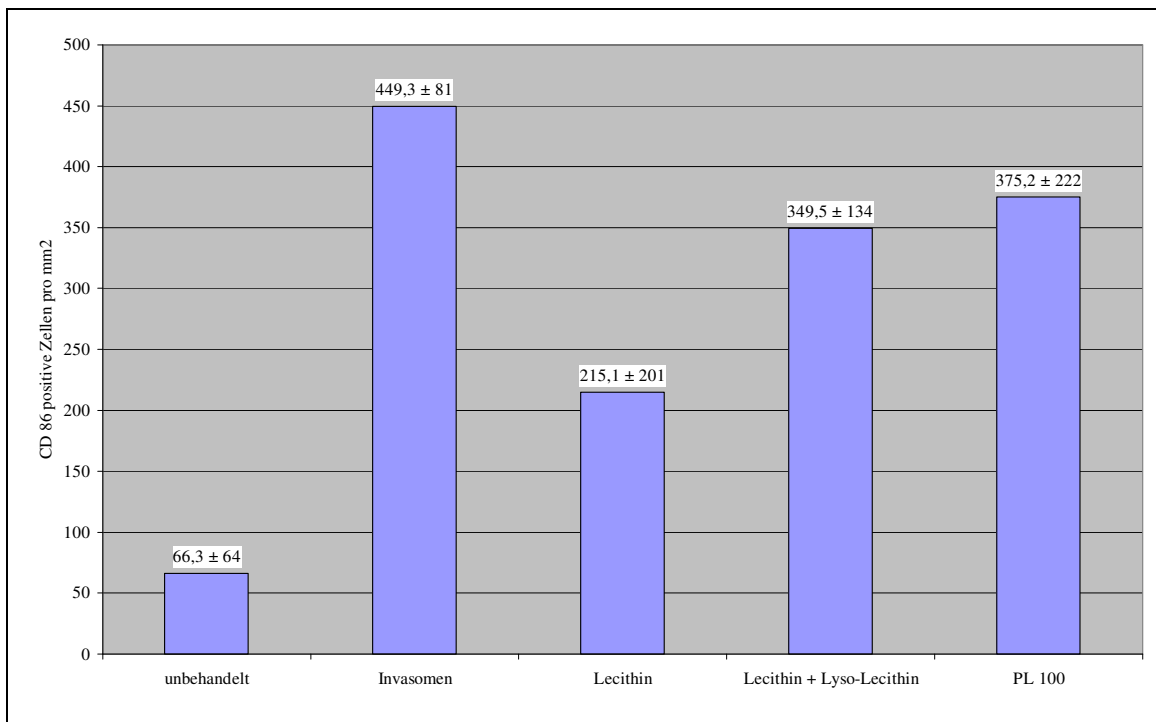


**Abb. 3.9: CD 86 Expression nach Applikation von Invasomen**  
**Originalvergrößerung: 200x** - Es ist eine große Zahl positiv gefärbter LC zu sehen. Morphologisch zeigten die Zellen zahlreiche dendritische Fortsätze.

Um die Anzahl der CD 86 positiv gefärbten Zellen zu objektivieren, wurden die Epidermal-sheets verblindet ausgezählt. Bei jeder Formulierung wurden 4 Epidermal-sheets (2x außen, 2x innen) ausgewertet, die jeweils 5 mal ausgezählt wurden. Es wurden also insgesamt 20 Gesichtsfelder pro Liposomenformulierung ausgewertet.

Zählung (n)	unbehandelt		Invasomen		Lecithin		Lecithin + Lyso-Lecithin		PL 100	
	außen	innen	außen	innen	außen	innen	außen	innen	außen	innen
A 1	43	183	501	474	503	173	374	148	676	494
A 2	22	26	566	423	407	127	447	204	531	166
A 3	30	42	497	392	497	163	343	176	601	372
A 4	29	11	460	421	477	69	341	279	560	447
A 5	42	44	303	469	580	129	216	344	518	487
B 1	33	145	396	366	57	157	316	419	486	202
B 2	20	77	523	313	114	39	612	209	12	140
B 3	15	206	380	361	94	73	303	173	164	115
B 4	22	145	392	301	0	83	297	307	151	228
B 5	37	51	395	352	0	224	567	370	491	78
Mittelwert	29,3	93	441,3	387,2	272,9	123,7	381,6	262,9	419	272,9
pos. Zellen pro mm <sup>2</sup>	66,3		449,3		215,1		349,5		375,2	
1. Standardabweichung	± 64		± 81		± 201		± 134		± 222	

**Tab. 3.3: CD 86 Expression nach Applikation von Liposomen**



### Dgr. 3.3: CD 86 Expression nach Liposomenapplikation

Die Auszählung zeigt, dass die durchschnittliche Zahl CD 86 positiver Zellen nach Applikation von Invasomen am größten war. Mit Invasomen konnte also, verglichen mit den anderen Liposomenformulierungen, die stärkste Aktivierung von LC erreicht werden. Die Standardabweichung war dabei verglichen mit den anderen Liposomenformulierungen am geringsten. Dies zeigt, dass die CD 86 positiven Zellen relativ gleichmäßig über das Ohr verteilt sind.

Es konnten bis zu 500 CD 86 positiv gefärbte LC pro mm<sup>2</sup> gezählt werden. Somit lagen über 50 % der LC im aktivierten Zustand vor. Die drei anderen Liposomenformulierungen zeigten ebenfalls eine starke CD 86 Expression, verglichen mit den unbehandelten Mäusen. Ebenfalls fiel auf, dass die äußeren Ohren mehr positive Zellen zeigten als die inneren Ohren. Dieser Versuch wurde 3 mal wiederholt, wobei jedesmal die Invasomen im Vergleich zu den anderen Liposomenformulierungen die stärkste CD 86 Expression zeigten.

### 3.8 FACS-Messung der Leukozytenpopulation in den Lymphknoten nach Liposomenapplikation

Um den Einfluss von Liposomen auf das Immunsystem zu beurteilen, wurde untersucht, ob die durch Liposomen aktivierten LC in die Lymphknoten wandern. Dazu wurden den Mäusen die cervicalen Lymphknoten entnommen und zu einer Einzelzellsuspension verarbeitet (Material und Methoden 2.2.6). Die Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen MHC II und CD 86 gefärbt und anschließend im FACS gemessen. Die toten Zellen wurden dabei mit Propidiumjodid ausgegated.

Die mit Liposomen behandelten Mäuse zeigten einen Anstieg sowohl der MHC II als auch der CD 86 Expression. Die Zahl der doppelt positiven Zellen stieg nach Liposomenapplikation an. Dabei war bei den Invasomen im Vergleich zu den anderen Liposomenformulierungen der stärkste Anstieg zu verzeichnen. Das Experiment wurde 3 mal durchgeführt. Ein exemplarisch dargestelltes Experiment ergab folgendes Ergebnis:

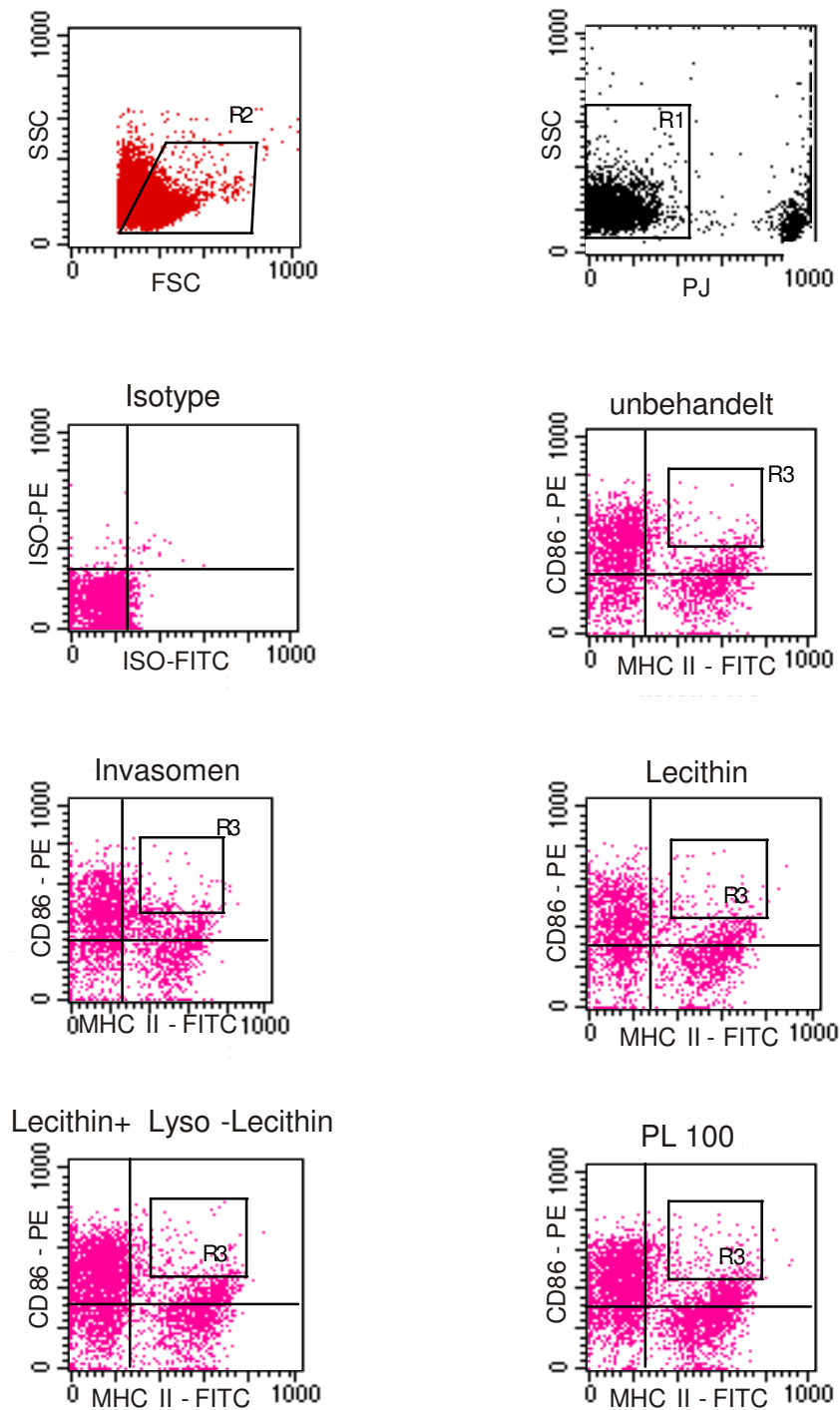
Behandlung Maus	Zellen in upper right in %	Zellen in R3 in %
unbehandelt	16,9	3,0
Invasomen	23,4	4,6
Lecithin-Liposomen	19,8	3,6
Lecithin+Lyso-Lecithin Liposomen	16,7	3,2
PL 100 Liposomen	22,0	4,2

**Tab. 3.4: Zunahme der MHC II und CD 86 positiven Zellen in upper right und R3 nach Liposomenapplikation. Die Invasomen führen zur stärksten Zunahme.**

Die FACS-Messungen wurden von Herrn Dr. Abdo Konur durchgeführt.

## FACS-Färbung der Zellen aus cervicalen Lymphknoten

MHC II und CD86 nach Applikation von Liposomen



**Dgr. 3.4: Zunahme der MHC II und CD 86 positiven Zellen in cervicalen LN nach Applikation von Liposomen. Die Invasomen führen zu der stärksten Zunahme.**

## **4 Diskussion**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der transcutanen Immunisierung durch liposomale Antigene. An einem Mausmodell wurden verschiedene Liposomenformulierungen daraufhin untersucht, ob sie die Haut penetrieren können und zu einer Aktivierung von Langerhanszellen (LC) führen. Darüberhinaus wurde die Migration von LC in die dränierenden Lymphknoten nach Liposomenapplikation untersucht. In den Lymphknoten sollte überprüft werden, welche Auswirkungen die Exposition von Antigenen auf die Leukozytenpopulation im Lymphknoten hat. Auf diesem Weg kann abgeschätzt werden, ob Liposomen LC stimulieren können. Dies hat Bedeutung bei der topischen Vaccinierung gegen Tumorantigene.

### **4.1 Anfertigung und Beurteilung der Epidermal-sheets**

Zur Untersuchung der LC im Mäuseohr musste eine Methode entwickelt werden, die zuverlässig die Beurteilung der Oberflächenantigene der Zellen erlaubt. Dabei erwies es sich als vorteilhaft keinen Querschnitt der Haut zu untersuchen, sondern die gesamte Epidermis des Mäuseohrs zu präparieren, um die LC gut beurteilen zu können. Bei der Testung verschiedener Methoden war besonders von Bedeutung, dass die Präparationsmethode möglichst wenig die Struktur der LC beeinflusst. Da Dendritische Zellen (DC) sehr empfindlich sind und allein durch mechanische Manipulation aktiviert werden können [Gallucci et al., 1999], musste eine Methode gefunden werden, bei der diese Störfaktoren minimal waren. Bei der Messung des Aktivierungszustandes von LC besteht die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen, die durch die Präparationsmethode bedingt sind. Aus diesem Grund waren Negativkontrollen unbehandelter Mäuse wichtig, um auszuschließen, dass die LC bei der Präparation aktiviert werden.

Auf der anderen Seite musste darauf geachtet werden, dass bei einer Behandlung der Mäuseohren die Oberflächenantigene nicht zerstört werden. Deshalb musste beim Ablösen der Epidermis auf Enzyme verzichtet werden. Dies hätte sonst zu falsch negativen Ergebnissen führen können.



---

Das Ziel war eine Methode zu finden, bei der der Einfluss der Liposomen auf LC objektiv beurteilt werden kann. Optimal ist eine Methode der Präparation, bei der in möglichst wenigen Schritten die Epidermal-sheets präpariert werden können und bei der nur eine kurze Zeit bis zur Fixierung vergeht.

Um die Methode zu etablieren, wurden die Versuche zuerst mit FITC in einer Lösung von Aceton/Dibutylphthalate (A/D) durchgeführt. FITC ist eine etablierte Substanz zur Induktion einer „delayed type hypersensitivity“ (DTH) [Sato et al. 1998]. Mit FITC in A/D konnte in den Experimenten eine gute Stimulation der LC erzielt werden. Diese Präparate können als Positivkontrolle verwendet werden. So kann die Aktivierung der LC, die durch Liposomen erzielt wird, mit einer etablierten Substanz verglichen werden. Anhand der Experimente mit FITC konnte gezeigt werden, dass mit Epidermal-sheets saubere Negativ- und Positivkontrollen erzielt werden können (Ergebnisse 3.5).

Versuche eine Einzelzellsuspension der Epidermis herzustellen, um die LC im FACS zu messen, waren mit verschiedenen Schwierigkeiten verbunden. Da die Haut eine sehr feste Struktur hat, erwies es sich als kompliziert, die LC aus dem Zellverband zu lösen, ohne sie durch die Manipulation zu aktivieren oder die Oberflächenantigene zu zerstören. Da DC in Kultur durch alleiniges Ablösen von der Kulturschale aktiviert werden können [Gallucci et al., 1999], ist es verständlich, dass bei Anfertigung einer Einzelzellsuspension erhebliche Störfaktoren in das Ergebnis mit einfließen. Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass die Haut, anders als Lymphknoten oder Milz, ein sehr festes Gewebe ist, da sie dem Schutz des Körpers vor mechanischen Kräften dient. Es war nicht möglich durch mechanisches Zerkleinern eine suffiziente Zahl an LC aus der Haut für eine FACS-Analyse zu gewinnen.

Ein üblicher Weg zur Gewinnung von LC im Tierversuch ist deshalb die Inkubation der Maushaut in Medium unter Kulturbedingungen. Die LC wandern aus der Haut in das Medium und setzen sich am Boden der Kulturschale ab [Romani et al., 2001]. Diese Methode funktionierte gut, und es konnten relevante Mengen von LC geerntet werden (Ergebnisse 3.4). Diese konnten jedoch nicht für die Messung des Aktivierungszustandes verwendet werden, da die Zellen unabhängig von der Vorbehandlung maximal

enddifferenziert waren. Ein Einfluss der zuvor applizierten Antigene konnte nicht nachgewiesen werden.

Für die Untersuchungen des Aktivierungszustandes von LC nach Applikation von Antigenen erwies sich die Präparation von Epidermal-sheets daher als Methode der Wahl. Dabei ist zu berücksichtigen, dass eine immunhistochemische Färbung nur dann möglich war, wenn die Epidermis so auf Objektträger aufgebracht wurde, dass die dermale Seite nach oben zeigte (Ergebnisse 3.2). Da die korrekte Lage der Epidermal-sheets bei einer Färbung auf Objektträgern nicht sicher zu gewährleisten war, musste die Färbung in 24-Well Platten durchgeführt werden, auch wenn dadurch wesentlich mehr Antikörper und Färbereagenzien benötigt wurden (Material und Methoden 2.2.8). Dabei musste sichergestellt werden, dass die Epidermal-sheets während des gesamten Färbevorgangs vollständig entfaltet waren.

Ein Nachteil dieser Methode ist die schwierige Quantifizierung der Ergebnisse. Eine Beurteilung der Zahl positiv gefärbter Zellen war nur durch manuelles Auszählen möglich. Dabei ist das Ergebnis auch vom Untersucher abhängig, da in den Experimenten auch schwach positive Zellen auftraten, die nicht eindeutig positiv oder negativ zu werten waren. Hier musste der Untersucher eine Grenze definieren, ab der er die Zellen positiv wertet. Durch eine verblindete Auszählung wurde jedoch sichergestellt, dass der Untersucher unvoreingenommen die Epidermal-sheets auswertet (Material und Methoden 2.2.12).

Schwierig war der Vergleich von Ergebnissen verschiedener Versuchsserien. Da geringe Veränderungen der Versuchsbedingungen die Größenordnung der positiven Zellen beeinflussten, sind Experimente die zu verschiedenen Zeitpunkten gemacht wurden nur schwer bezüglich ihrer Quantifizierung zu vergleichen. Vor allem die Inkubationszeit des Substrates war entscheidend für die Intensität der Färbung. Bei der Auswertung wurden daher immer nur die Ergebnisse einer Versuchsserie quantitativ miteinander verglichen.

Auch wenn die Quantifizierung der Ergebnisse mit Schwierigkeiten verbunden ist, so ist die Technik der Epidermal-sheets trotzdem die Methode der Wahl für die Beurteilung des

Aktivierungszustandes von LC in der Epidermis. Durch eine schnelle Fixierung werden die Zellen vor nachträglicher Manipulation geschützt. So ist eine große Zahl von Zellen der Epidermis beurteilbar, und auch die Morphologie der Zellen kann untersucht werden.

## 4.2 Verteilung von Langerhanszellen

Zur Anzahl und zur Verteilung von Langerhanszellen (LC) in der Haut gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Jung gibt eine sehr variable Dichte von LC an. Im Mittel beträgt sie  $450 \text{ LC} / \text{mm}^2$  [Jung et Moll, 2003]. Fritsch beschreibt eine gleichmäßige Besiedlung der Haut von ca.  $700 \text{ LC} / \text{mm}^2$  [Fritsch, 1998]. Bhushan beschreibt beim Menschen eine Altersabhängigkeit. Beim jungen Menschen beträgt sie  $1156 \text{ LC} / \text{mm}^2$  und beim alten Menschen  $836 \text{ LC} / \text{mm}^2$  [Bhushan et al., 2002].

Unsere Untersuchungen ergaben eine Zahl von etwa  $800 \text{ Zellen} / \text{mm}^2$  am Mausohr (Ergebnisse 3.3). Ein reproduzierbarer Unterschied zwischen Innen- und Außenseite des Mäuseohres bezüglich der Zellzahl ließ sich nicht feststellen. Eine wichtige Frage war, inwieweit die Exposition von Antigenen Einfluss auf die Anzahl der LC und die Intensität der MHC II Färbung haben. Da bekannt ist, dass LC nach Antigenexposition in die Lymphknoten abwandern [Banchereau et Steinman, 1998] ist es vorstellbar, dass es zu einer Reduktion der Zellzahl in der Epidermis kommt. Kimber beschreibt eine Abnahme der LC in der Epidermis nach  $\text{TNF-}\alpha$  Exposition [Kimber et al., 2000].

Andererseits ist beschrieben, dass die LC verstärkt MHC II exprimieren, wenn sie durch Antigene aktiviert werden [Mellman et Steinman, 2001]. Ebenfalls kann diskutiert werden, ob durch Stimulation mit Antigenen LC verstärkt in die Haut rekrutiert werden.

Die Experimente zeigten, dass eine Antigenexposition weder auf die Zahl der MHC II positiven LC, noch auf die Intensität der Färbung einen messbaren Einfluss hat (Ergebnisse 3.3). Dabei muss diskutiert werden, ob die Methode möglicherweise nicht in der Lage ist geringe Differenzen bei MHC II Expression aufzuzeigen. Möglicherweise gleichen sich eine Abwanderung der Zellen und eine verstärkte Expression von MHC II der verbliebenen Zellen soweit aus, dass bei der Messung daraus eine konstante Zellzahl resultiert. Durch Verwenden eines Isotyp-Antikörpers konnte sichergestellt werden, dass die Färbung

spezifisch MHC II zeigt. Die Unabhängigkeit des Ergebnisses von der Antigenexposition kann also nicht daran liegen, dass mit der Färbung unspezifische Strukturen der LC gezeigt worden sind.

### **4.3 CD 86 Expression von Langerhanszellen**

Nach Reifung von Dendritischen Zellen (DC) wird eine Zunahme der CD 86 Expression um den Faktor 100 beschrieben. MHC II wird dagegen nur um den Faktor 5-10 hochreguliert [Mellman et Steinman, 2001]. Die CD 86 Expression kann also als wichtiger Indikator für den Reifungszustand bezeichnet werden. Hier muss unterschieden werden, zwischen der Stärke der CD 86 Expression der einzelnen Zelle und der Zahl der CD 86 positiven Zellen in einem Epidermal-sheet. Gezählt wurde bei den Experimenten die Zahl der positiven Zellen, wobei eine subjektive Schwelle festgelegt werden musste, ab welcher Färbeintensität die Zellen als positiv zu werten sind (Material und Methoden 2.2.12).

Nach Applikation von Antigenen konnte in den Experimenten eine massive Zunahme der Anzahl von CD 86 positiven Zellen und auch ein verstärkte Intensität der CD 86 Färbung beobachtet werden (Ergebnisse 3.5). Die Antigene induzieren also einen Reifungsprozeß der LC, welcher mit einer Hochregulation der costimulatorischen Moleküle auf den LC einhergeht.

Es wurden standardisiert 25 µl Antigen pro Ohrhälfte appliziert. Beim Austesten verschiedener Mengen war diese Dosis ideal, um das ganze Ohr zu benetzen und das Einziehen zu gewährleisten. Kleinere Mengen haben dazu geführt, dass nur Teile des Ohres benetzt wurden, größere Mengen konnte das Ohr nicht aufnehmen und wurden vom Tier im Käfig verteilt. Ein Experiment bei dem verschiedene Dosen eines Antigens verglichen werden, erschien deshalb als nicht sinnvoll (Material und Methoden 2.2.1).

### **4.4 Stimulation durch FITC und Aceton-Dibutylphthalate (A/D)**

Fluorescein 5-isothiocyanate (FITC) gelöst in Aceton-Dibutylphthalate (A/D) ist ein in der Literatur häufig verwendetes Antigen zur Aktivierung von LC [Kripke et al., 1990]. Es wurde gezeigt, dass sich mit dieser Substanz eine "delayed type hypersensitivity" (DTH) induzieren lässt, die sich in einer Schwellung des Ohres zeigt. Dabei muss AD / FITC

zweimal in einem Abstand von 7 – 14 Tagen auf die Haut appliziert werden. Das Lösungsmittel A/D alleine reicht nicht aus, um eine Schwellung zu induzieren [Sato et al., 1998]. Die LC wandern nach Applikation von FITC in die regionalen Lymphknoten [Kripke et al., 1990]. Dabei stellt sich die Frage, wie diese Substanzen den Aktivierungszustand der LC beeinflussen. Zum einen wäre vorstellbar, dass nur A/D - FITC in der Lage ist einen Reifungsprozess bei LC zu induzieren und A/D die LC nicht stimulieren kann. Andererseits könnte sowohl das Lösungsmittel als auch A/D - FITC eine Reifung induzieren. Die entscheidende Struktur über die Induktion einer DTH würde dann im Lymphknoten liegen.

Es konnte zwischen A/D - FITC und dem Lösungsmittel A/D auf Ebene der LC kein Unterschied bezüglich der Expression von CD 86 nachgewiesen werden. Das Lösungsmittel A/D alleine konnte die LC genauso wie A/D – FITC aktivieren (Ergebnisse 3.6).

Um eine Immunantwort zu induzieren, muss das applizierte Antigen in die regionalen Lymphknoten gelangen [O'Hagan, 2001]. Eine Aktivierung von LC ist also eine notwendige, jedoch keine hinreichende Bedingung für die Induktion einer Immunantwort. Eine Aktivierung der LC kann anzeigen, ob die Zellen von einem Antigen erreicht werden. Ob das Antigen jedoch Bedeutung für den Organismus hat, und ob das Individuum eine systemische Immunantwort induziert, wird im Lymphknoten entschieden. Die Interaktion zwischen DC und T-Zellen entscheidet, ob ein Stoff als fremd erkannt wird [Abbas et Lichtman, 2003].

#### **4.5 Zeitkinetik der CD 86 Expression**

Für die Beurteilung der CD 86 Expression nach Antigenapplikation ist die Inkubationszeit von entscheidender Bedeutung. Um den optimalen Zeitpunkt für die Inkubationsdauer zu finden, wurde eine Zeitkinetik mit A/D - FITC durchgeführt (Ergebnisse 3.6). Nach 4 und 8 Stunden ist die durchschnittliche CD 86 Expression höher als nach 16 und 24 Stunden. Eine Inkubationszeit von 4 - 8 Stunden schien optimal, um eine maximale Aktivierung der LC zu erzielen. Die Reduktion der CD 86 Expression nach 16 h könnte durch eine Abwanderung der LC in die Lymphknoten verursacht sein.

Die Experimente mit liposomalen Antigenen zeigten jedoch, dass nach 4 h Inkubationsdauer nur eine relativ schwache Expression von CD 86 vorhanden ist. Hier war eine Zeitdauer von 16 h optimal, um eine hohe Expression von CD 86 zu erzielen (Ergebnisse 3.6). Dies weist darauf hin, dass die Penetration der Haut und die Aktivierung der LC bei Liposomen länger dauert als bei dem lipophilen Lösungsmitteln A/D. Auch bei der Applikation der Substanzen ließen sich Differenzen beim Einziehen des Antigens ausmachen (Material und Methoden 2.2.1). Die liposomalen Antigene konnten nur bei narkotisierten Mäusen appliziert werden, wogegen das Lösungsmittel sofort in die Haut einzog. Die hydrophilen Liposomen haben eine andere Kinetik bei der Penetration der Haut als das lipophile Lösungsmittel. Sie brauchen länger, um zu den LC zu gelangen. Trotzdem können sie sehr effektiv LC aktivieren.

#### **4.6 CD 86 Expression nach Applikation von Liposomen**

Bei den Experimenten zu dieser Arbeit wurden vier Typen von Liposomen auf Mäuseohren appliziert und anschließend die CD 86 Expression der LC immunhistochemisch gemessen. Hierbei wurden Invasomen mit konventionellen Liposomen verglichen, um abschätzen zu können, ob sich die Vorteile der Invasomen bei der Applikation von Cyclosporin A [Verma, 2002] auch für die transcutanen Tumervaccinierung nutzen lassen.

Die Experimente zeigen, dass die Applikation von Liposomen zu einer starken Zunahme der CD 86 Expression von LC führt. Dabei wiesen die Invasomen eine sehr starke CD 86 Expression von bis zu 500 positiven LC pro  $\text{mm}^2$  auf (Ergebnisse 3.7). Die Aktivierung war erheblich stärker als bei A/D - FITC das ursprünglich als Positivkontrolle gedacht war (Ergebnisse 3.6). Es lagen, verglichen mit der Zellzahlbestimmung (Ergebnisse 3.3), über 50% der LC im aktivierten Zustand vor. Bei dreimaliger Wiederholung des Experimentes zeigten die Invasomen jedes Mal die stärkste CD 86 Expression. Dabei waren die CD 86 positiven LC sehr gleichmäßig über das gesamte Ohr verteilt, was sich in einer niedrigen Standardabweichung ausdrückte. Die herkömmlichen Liposomen wiesen auch eine relativ starke Aktivierung auf, diese war jedoch stets geringer als die der Invasomen. Auch waren die CD 86 positiven Zellen ungleichmäßiger verteilt als bei den Invasomen.

Es kann diskutiert werden, ob die Aktivierung der LC ein direkter Einfluss der Liposomen ist, oder ob bei der Reifung auch andere Zellen eine Rolle spielen. Ein wichtiges Zytokin bei der Aktivierung von LC ist TNF- $\alpha$ . Es wird von Keratinozyten vor allem bei Stress produziert und wirkt parakrin auf die umliegenden Zellen [Fritsch, 1998]. TNF- $\alpha$  ist ein wichtiges Stimulans zur Aktivierung von LC [Randolph, 2001]. Es kann also diskutiert werden, ob die Zunahme der CD 86 Expression durch einen direkten Stimulus der Liposomen oder durch eine indirekte Wirkung über Keratinozyten und Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$  zustande kommt. Anzunehmen ist, dass beide Wege einen Anteil an der Aktivierung der LC haben.

DC können auch ohne inflammatorische oder pathogene Stimuli in den Reifungsprozess eintreten. So wurde gezeigt, dass ein alleiniges Ablösen der DC von der Kulturschale bereits ausreicht, um eine Aktivierung in Gang zu setzen. Die Inkubation von DC mit syngenem apoptotischen Fibroblasten führte zu keiner Aktivierung, wogegen der Kontakt mit nekrotischen Fibroblasten zu einer Aktivierung führte [Gallucci et al., 1999]. Dies zeigt, dass es sich bei der Aktivierung von DC um einen sehr komplexen Vorgang handelt, bei dem viele verschiedene Zytokine eine Rolle spielen [Fritsch, 1998]. Im Detail können die Interaktionen der Zellen der Haut über Zytokine nur schwierig untersucht werden.

Wir konnten zeigen, dass durch Liposomen bei LC ein Reifungsprozess induziert werden kann. Dies macht sie als Adjuvants für eine Immuntherapie interessant. Ein möglicher Mechanismus der Stimulation von LC besteht in der Einschleusung von Lipopolysacchariden (LPS) in die Haut. Die Invasomen zeigten bezüglich der CD 86 Aktivierung die besten Ergebnisse. Da die Aktivierung von LC jedoch lediglich eine notwendige, jedoch keine hinreichende Bedingung ist, um eine Immunantwort zu induzieren [Abbas et Lichtman, 2003], mussten weitere Untersuchungen auf Ebene der Lymphknoten durchgeführt werden.

#### **4.7 Migration der LC nach Applikation von Liposomen**

Eine entscheidende Frage bei der Vaccinierung ist, ob applizierte Antigene auch in die dränierenden Lymphknoten gelangen, da nur so eine Immunantwort induziert werden kann [O'Hagan, 2001]. Um die Migration der LC nach Applikation von Liposomen zu messen,

wurden die Lymphknoten im Abflussgebiet untersucht (Ergebnisse 3.8). Die Messung der Einzelzellsuspension aus Lymphknoten im FACS ist eine etablierte Methode [Seo et al., 2000], so dass keine immunhistochemische Färbung notwendig war. Mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper kann mit dem FACS MHC II und CD 86 simultan bei verschiedenen Wellenlängen gemessen werden. Durch ein „gaten“ der doppelt positiven Zellen kann der Aktivierungszustand der Leukozytenpopulation beurteilt werden. Eine Messung mit dem FACS hat den Vorteil, dass eine große Anzahl von Zellen in kurzer Zeit maschinell ausgezählt werden kann. Die Messungen sind objektiver als die Beurteilung von immunhistochemischen Präparaten, da der Einfluss des Untersuchers geringer ist.

Die Experimente zeigten eine Zunahme der MHC II und CD 86 positiven Zellen in den cervicalen Lymphknoten nach Applikation von Liposomen (Ergebnisse 3.8). Dabei wiesen die Invasomen die stärkste Expression von MHC II und CD 86 auf.

Die Reaktion des Immunsystems auf die Liposomen ist also nicht nur auf die Epidermis beschränkt. Die Liposomen rufen auch im drainierenden Lymphabflussgebiet eine Reaktion hervor. Dabei ist anzunehmen, dass die Reaktion durch eine Migration der LC der Ohren in die Lymphknoten ausgelöst wurde. Die LC werden also durch die Liposomen nicht nur aktiviert, sondern gehen einen Reifungsprozess ein, der von einer Migration begleitet ist. Dass es sich bei den LC tatsächlich um mobile Zellen handelt, die von Epidermis in die Lymphknoten abwandern, konnte mit Hilfe von Hauttransplantaten gezeigt werden [Kripke et al., 1990]. Sie bilden eine Brücke zwischen dem Ort der Antigenkonfrontation und dem Ort der T-Zell Aktivierung [Romani et al., 2001]. Damit bestehen gute Aussichten mit Liposomen eine systemische T-Zell Antwort gegen spezifische Antigene auslösen zu können.

#### **4.8 Transcutane Immunisierung**

Eine Immunisierung über die Haut zu induzieren hat zahlreiche Vorteile. Die Epidermis ist mit zahlreichen LC ausgestattet, die Antigene effektiv präsentieren können [Romani et al., 2001]. Bei der transcutanen Immunisierung ist keine Nadel zur Applikation des Impfstoffes notwendig. In Entwicklungsländern sind Impfstoffe, die ohne Nadel appliziert werden



können, zu bevorzugen, da Risiken wie mehrfach verwendete Nadeln oder deren unsachgemäße Entsorgung wegfallen [Glenn et al., 2000].

Um eine T-Zell Antwort gegen ein Antigen zu induzieren muss das Antigen zusammen mit einem Adjuvants appliziert werden. Adjuvantien haben die Aufgabe, die Antigenaufnahme von DC zu erhöhen und als „danger“-Signal zu fungieren [O' Hagan, 2001]. Sie induzieren bei DC einen Reifungsprozess und erhöhen die Zahl der costimulatorischen Proteine [Abbas et Lichtman, 2003]. Weiterhin erhöhen sie die Immunogenität von schwachen Antigenen und induzieren eine zelluläre Immunität [O' Hagan, 2001]. Adjuvantien entscheiden mit darüber, ob eine immunologische Antwort gegenüber einem Antigen erzeugt werden kann. Dabei spielen „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP) eine entscheidende Rolle (Einleitung 1.4). Bestimmte Muster werden von den Toll-like-Rezeptoren als gefährlich erkannt und führen dann zur Aktivierung von DC [Krieg, 2001].

Ein klassisches Adjuvants sind Aluminiumsalze. [Mc Cluskie et Weeratna, 2001]. Mit ihnen kann jedoch nur schlecht eine zelluläre Immunantwort induziert werden [O'Hagan, 2001]. Auch besteht die Gefahr der Induktion einer allergischen Th-2 Antwort [Banchereau et al., 2001]. Auch Enterotoxine und Cholera toxin können als Adjuvants verwendet werden. Bei Versuchen einer transcutanen Immunisierung über ein Pflaster mit Entero- und Cholera toxin konnten IgG und IgA Titer sowie CD4+ und CD8+ T-Zellen nachgewiesen werden [Glenn et al., 2000]. Liposomen werden als neues Adjuvants diskutiert [Mc Cluskie et Weeratna, 2001]. Die Ergebnisse bei der Aktivierung von LC (Ergebnisse 3.7) unterstützen die Annahme, dass Liposomen als effektives Adjuvants eingesetzt werden können.

#### **4.9 Induktion einer zytotoxischen T-Zell Reaktion**

Die Experimente zeigen eine Immunantwort auf Ebene der LC. Liposomen können LC effektiv aktivieren und eine Migration induzieren. Eine DTH am Ort der Applikation des Impfstoffes steht stellvertretend für eine CD 8+ T-Zell Antwort [Jäger et al., 2003].

Trotzdem beantworten die Experimente nicht die Frage, ob die CD 86 Aktivierung auf Ebene der LC zu einer effektiven Stimulation der T-Zellen führt. Eine cytotoxische T-Zell

Antwort ist entscheidend über die Effektivität einer Impfung [Jäger et al., 2003]. Der Nachweis einer T-Zell Antwort ist schwierig zu führen. Dazu sind Experimente notwendig, bei denen die Liposomen mit einem Peptid gekoppelt werden. Mit Hilfe von T-Zell assays kann untersucht werden, ob es zu einer spezifischen T-Zell Antwort kommt.

Die Induktion einer spezifischen Immunantwort ist davon abhängig, ob die Peptidstruktur des Antigens zum MHC- Muster des Individuums passt [Falk et al., 1991]. Es muss also ein Peptidepitop beim Antigen vorhanden sein, das zu den Ankerpositionen der MHC-Moleküle passt (Einleitung 1.5).

#### **4.10 Einsatz von Liposomen bei der Tumorstimmulierung**

Eine cytotoxische T-Zell Reaktion kann genutzt werden, um Patienten mit malignen Tumoren zu therapieren. Das Maligne Melanom bietet sich für eine Immuntherapie an, da bei diesem Tumor spontane Regressionen beobachtet werden. Dafür wird eine immunologisch vermittelte Abstoßung von Tumorzellen verantwortlich gemacht [Jäger et al., 2001]. Eine Immunantwort gegen Tumorantigene kann bei einigen Patienten mit Krebserkrankungen nachgewiesen werden. Diese ist allerdings meist zu schwach, um den Tumor zu angreifen [Armstrong et al., 2002].

Bei Patienten mit metastasiertem Malignem Melanom gibt es verschiedene klinische Therapieversuche, bei denen die Induktion einer Immunität gegen Tumorantigene genutzt wird. Es können Tumorzelllysate verwendet werden. Dabei ist eine spezifische T-Zell Reaktion jedoch nur schwer nachzuweisen, da eine spezifische Zielstruktur fehlt [Jäger et al., 2003].

Es konnte jedoch bei Patienten mit Malignem Melanom gezeigt werden, dass die Applikation von DC, die mit Tumorpeptid oder Tumorzelllysate in vitro stimuliert wurden, in einigen Fällen zu einem Ansprechen und einer Regression der Metastasen führt. Autoimmunreaktionen wurden nicht beobachtet [Nestle et al., 1998]. Auch konnte gezeigt werden, dass in vitro gewonnene Melan-A spezifische cytotoxische T-Zellen, die HLA-A2 positiven Melanompatienten appliziert wurden, in vivo mehrere Wochen überleben und sich im Tumorgewebe anreichern [Meidenbauer et al., 2003].

Einen viel versprechenden Weg zeigten Experimente am Mausmodell, bei denen Tumorpeptide auf die Haut appliziert wurden [Seo et al., 2000]. Eine relevante Immunantwort konnte jedoch nur nach vorheriger Entfernung des gesamten Stratum corneum erzielt werden. Dazu wurde das entsprechende Hautareal zuvor mit Klebestreifen behandelt.

Der Einsatz einer Methode, bei der am Applikationsort das Stratum corneum entfernt wird, scheint beim Menschen mit Schwierigkeiten verbunden zu sein. Wünschenswert wäre eine Methode, bei der auch ohne Entfernung des Stratum corneums das Antigen die LC erreicht.

Liposomen bieten sich für die transcutane Applikation von Tumorpeptiden an, da sie als Vesikel in der Lage sind, Substanzen aufzunehmen und zu transportieren. Die Ergebnisse bei der transcutanen Applikation von Cyclosporin A mittels Invasomen [Verma, 2002] werfen die Frage auf, ob diese Liposomen auch zur Applikation von Tumorantigenen verwendet werden können. Verschiedene Faktoren beeinflussen die Möglichkeiten von Liposomen die Haut zu penetrieren. Dabei sind die Molekülgröße, die lipophilen Anteile der Formulierung und die Beschaffenheit des Stratum corneums von Bedeutung. Liposomen können als vesikuläre Strukturen hydrophile Substanzen aufnehmen und in die Haut transportieren [Verma et al., 2003b].

Beim Malignen Melanom sind verschiedene Tumorpeptide beschrieben. So sind MART-1, NY-ESO-1, MAGE und TRP-2 mögliche immunologische Zielstrukturen [Khong et al., 2002]. Für die in den Experimenten verwendeten C57 black 6 Mäuse kommen die H-2Kb restringierten Peptide in Frage. Mit dem H-2Kb restringierten TRP-2, konnte eine Immunisierung bei diesem Mausstamm nachgewiesen werden. Dabei wurde das Peptid über die Haut appliziert, bei der das Stratum corneum zuvor mit Klebeband entfernt wurde. Die topische Applikation auf die Epidermis erwies sich als effektiver als die intradermale Injektion [Seo et al., 2000].

Damit ist dieses Tumorpeptid eine mögliche Zielstruktur für die Entwicklung einer Immuntherapie beim Malignen Melanom. Die Applikation über die Haut bietet sich an, da

---

auf diese Weise eine große Zahl DC Antigenkontakt haben. Dabei ist die DTH Modell für die Induktion einer Immunantwort [Jäger et al., 2001].

Eine cytotoxische T-Zell Antwort gegen Tumorantigene muss jedoch nicht notwendigerweise mit einer klinischen Besserung von Patienten einhergehen. Wichtige prognostische Parameter bei Patienten sind Homogenität und Stärke der Expression von Antigenen und MHC Molekülen im Tumorgewebe. Auch T-Zell Infiltrate im Tumorgewebe sind ein guter prognostischer Faktor [Jäger et al., 2003].

Eine Gefahr bei der Vaccinierung gegen spezifische Tumorpeptide ist die Induktion einer Toleranz. Diese Gefahr besteht vor allem dann, wenn die DC keinen Reifungsprozess eingehen. Es wurde beobachtet, dass die Injektion von unreifen DC in Lymphknoten zu keiner Immunantwort oder sogar zu einer Toleranz führt. Reife DC können dagegen eine signifikante Immunantwort induzieren [Banchereau et al., 2001]. Auch eine Antigenaufnahme über den DEC-205 Rezeptor, der auf unreifen DC stark exprimiert wird, kann Toleranz induzieren [Bonifaz et al., 2002]. Bei der transcutanen Tumervaccinierung muss also darauf geachtet werden, dass die DC mit einem Adjuvants stimuliert werden, das zuverlässig einen Reifungsprozess induziert. Die Experimente zeigen, dass Liposomen diese Anforderungen erfüllen.

Eine wichtige Frage ist, inwieweit sich die Experimente am Mausmodell auf den Menschen übertragen lassen. Es gibt Differenzen, sowohl in der Dicke als auch im Lipidgehalt, zwischen muriner und menschlicher Epidermis [Glenn et al., 2000]. Daher können die Ergebnisse am Mausmodell nicht direkt auf den Menschen übertragen werden. Hier könnten Experimente an menschlicher Haut weiterhelfen. Dazu kann überschüssige Haut, die bei plastischer Chirurgie anfällt verwendet werden [Verma et al., 2003a].

#### **4.11 Ausblick**

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse könnten einen Ansatzpunkt bei der transcutanen Tumervaccinierung darstellen. Nachdem sowohl auf Ebene der LC in der Haut als auch in den dränierenden Lymphknoten, der Nachweis einer effektiven Stimulation erbracht werden konnte, stellt sich die Frage, ob sich auch eine cytotoxische T-

Zell Antwort induzieren lässt. Dazu müssen Liposomen hergestellt werden, die mit Tumorpeptiden beladen sind. Mit T-Zell assays kann dann untersucht werden, inwieweit sich MHC I restringierte antigenspezifische CD 8+ cytotoxische T-Zellen induzieren lassen.

Eine spezifische T-Zell Immunität gegen das H-2Kb restringierte TRP-2, ein Tumorantigen beim Malignen Melanom, ist bei C57 black 6 Mäusen demonstriert worden [Seo et al., 2000]. Das TRP-2 Antigen ist beim Menschen HLA-A2 restringiert [Khong et Rosenberg, 2002]. Dieses MHC-Allel kommt bei 28,9% der Europäischen Bevölkerung vor [Gemsa et al., 1997]. Das Peptid stellt somit eine interessante Zielstruktur dar, da es bei vielen Patienten mit Malignem Melanom zur Vaccinierung eingesetzt werden könnte.

## 5 Zusammenfassung

In den letzten Jahren hat die Wissenschaft zahlreiche neue Erkenntnisse zur transcutanen Tumorstimmisierung gewonnen. Die Langerhanszellen nehmen dabei als Dendritische Zellen der Epidermis eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Immunsystems ein [Romani et al., 2001].

Dendritische Zellen haben in der Tumorstimmologie eine große Bedeutung, da sie als Antigenpräsentierende Zellen die Zielstruktur für eine Immunisierung gegen Tumorstigene darstellen [Banchereau et al., 2001]. Beim Malignen Melanom gibt es Strategien zur transcutanen Stimmisierung gegen spezifische Tumorstigene [Seo et al., 2000].

Die transcutane Immunisierung ist durch einen robusten Schutzmantel der Haut erschwert. Hydrophile Lösungen können nur schwer durch das Stratum corneum bis zu den Langerhanszellen gelangen [Glenn et al., 2000]. Bisher musste das Stratum corneum mechanisch entfernt werden, um eine cytotoxische T-Zell Antwort über die Haut zu induzieren [Seo et al., 2000].

Die Ergebnisse bei der transcutanen Applikation von Cyclosporin A mittels Liposomen [Verma, 2002] werfen die Frage auf, ob Liposomen auch zur Applikation von Tumorstigenen verwendet werden können. Dabei könnte auf ein mechanisches Entfernen des Stratum corneums verzichtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wird am Mausmodell gezeigt, dass Langerhanszellen durch Applikation von Liposomen auf die intakte Haut aktiviert werden können. Dies zeigt sich in einer Zunahme der CD 86 Expression.

Die Langerhanszellen gehen einen Reifungsprozess ein, der zu einer Migration in die dränierenden Lymphknoten führt. In den Leukozytenpopulationen der dränierenden Lymphknoten konnte eine Zunahme der MHC II und CD 86 positiven Zellen nachgewiesen werden.

Die Liposomen können über die intakte Haut effektiv Langerhanszellen aktivieren und stellen ein interessantes Transportvehikel und Adjuvants für die transcutane Vaccinierung gegen Tumorantigene dar.

## 6 Literaturverzeichnis

- **Abbas A. K., Lichtman A. H.** (2003). Cellular and Molecular Immunology (5th edition), Saunders, Philadelphia
  
- **Aberer W., Romani N., Elbe A., Stingl G.** (1986). Effects of Physiochemical agents on murine Epidermal langerhans cells and THY-1-positive dendritic epidermal cells. *J. Immunol.* **136** : 1210-1216.
  
- **Armstrong A. C., Eaton D., Ewing J.C.** (2002). Cellular vaccine therapy for cancer. *Expert Rev. Vaccines* **3** : 303-316
  
- **Banchereau J., Schuler-Thurner B., Palucka A. K., Schuler G.** (2001). Dendritic Cells as Vectors for Therapy. *Cell* **106** : 271-274
  
- **Banchereau J., Steinman R.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity *Nature* **392** : 245-252.
  
- **Barry B. W.** (2001). Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery *J. Pharm. Sci.* **14** : 101-114
  
- **Belyakov I. M., Hammond S. A., Ahlers J. D., Glenn G. M., Berzofsky J. A.** (2004). Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells *J.Clin. Invest* **113** : 998-1007
  
- **Bhushan M., Cumberbatch M., Dearman R. J., Andrew S.M., Kimber I., Griffiths C. E. M.** (2002). Tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced migration of human Langerhans cells: the influence of ageing. *Br. J. Dermatol.* **146** : 32-40



- 
- **Bonifaz L., Bonnyay D., Mahnke K., Rivera M., Nussenzweig M.C., Steinman R.M.** (2002). Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8+ T Cell Tolerance. *J.Exp.Med.* **196** : 1627-1638.
  
  - **Brinkmann O. A., Roigas J., Hertle L.** (2002). Systemische Immuntherapie des metastasierten Nierenzellkarzinoms und ihre Langzeitergebnisse. *Urologe* **41**: 231-238
  
  - **Falk K., Rötzschke O., Stevanovic S., Jung G., Rammensee H.-G.** (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351** : 290-296
  
  - **Fritsch P.** (1998). Dermatologie und Venerologie : Lehrbuch und Atlas, Springer Verlag Berlin Heidelberg. ISBN: 3-540-61169-X
  
  - **Gallucci S., Lolkema M., Matzinger P.** (1999). Natural adjuvants: Endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* **5** : 1249-1255
  
  - **Gemsa D., Kalden J. R., Resch K.** (1997). Immunologie Grundlagen – Klinik – Praxis (4. Auflage) Georg Thieme Verlag Stuttgart ISBN: 3-13-534804-0
  
  - **Glenn G.M., Taylor D. N., Li X., Frankel S., Montemarano A., Alving C. R.** (2000). Transcutaneous immunization: A human vaccine delivery strategy using a patch. *Nat. Med.* **6** : 1403-1406
  
  - **Hof H., Dörries R., Müller R. L.** (2000). Duale Reihe Mikrobiologie Georg Thieme Verlag Stuttgart ISBN: 3-13-125311-8
  
  - **Jäger D., Jäger E., Knuth A.** (2001). Vaccination for Malignant Melanoma: Recent Developments. *Oncol.* **60** : 1-7

- 
- **Jäger E., Jäger D., Knuth A.** (2003). Antigen-specific Immunotherapy and cancer vaccines. *Int. J. Cancer* **106** : 817-820
  - **Jérôme V., Graser A., Müller R., Kontermann R. E., Konur A.** (2005). High avidity cytotoxic T lymphocytes against B16 melanoma are induced by liposome-encapsulated TRP-2 peptide and CpG oligonucleotide adjuvant. (submitted paper)
  - **Jung E. G., Moll I.** (2003). Duale Reihe Dermatologie Georg Thieme Verlag Stuttgart ISBN: 3-13-126685-6
  - **Junqueira L.C., Carneiro J.** (1996). Histologie. Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen (4. Auflage) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York ISBN: 3-540-60404-9
  - **Khong H.T., Rosenberg S.A.** (2002). Pre-Existing immunity to Tyrosinase-Related Protein (TRP)-2, a New TRP-2 Isoform, and the NY-ESO-1 Melanoma Antigen in a Patient with a Dramatic Response to Immunotherapy. *J. Immunol.* **168** : 951-956
  - **Kiehl W., Steffens I., Fehrmann S.** (2003). Epidemiologisches Bulletin. *Robert Koch Institut* **32**
  - **Kimber I., Cumberbatch M., Dearman R.J., Bhushan M., Griffiths C.E.M.** (2000). Cytokines and chemokines in the initiation and regulation of epidermal Langerhans cell mobilisation. *Br. J. Dermatol.* **142** : 401 - 412
  - **Krieg A.** (2001). Now I know my CpGs. *Tr. Microbiol.* **9** : 249-252
  - **Kripke M. L., Munn C. G., Jeevan A., Tang J., Bucana C.** (1990). Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J. Immunol.* **145** : 2833 - 2838

- 
- **Martín-Fontecha A., Sebastiani S., Höpken U. E., Uguccioni M., Lipp M., Lanzavecchia A., Sallusto F.** (2003). Regulation of Dendritic Cell Migration to the Draining Lymph Node: Impact on T Lymphocyte Traffic and Priming. *J. Exp. Med.* **198** : 615 - 621
  
  - **Mc Cluskie M. J., Weeratna R.D.** (2001). Novel Adjuvant Systems. *Curr. Drg. Tar. – Infect. Dis.* **1** : 263 - 271
  
  - **Meidenbauer N., Marienhagen J., Laumer M., Vogl S., Heymann J., Andreesen R., Mackensen A.** (2003). Survival and Tumor Localization of Adoptively Transferred Melan-A-Specific T Cells in Melanoma Patients. *J. Immunol.* **170** : 2161-2169
  
  - **Mellman I., Steinman R. M.** (2001). Dendritic Cells: Specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106** : 255-258
  
  - **Nestle F. O., Alijagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D.** (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide or tumor lysate pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* **4** : 328-332
  
  - **O' Hagan D. T.** (2001). Recent Developments in Vaccine Delivery Systems. *Curr. Drg. Tar. – Infect. Dis.* **1** : 273-286
  
  - **Peachman K. K., Rao M., Alving C. R.** (2003). Immunization with DNA through the skin. *Meth.* **31** : 232-242
  
  - **Randolph G. J.** (2001). Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Sem. Immunol.* **13** : 267-274
  
  - **Romani N., Ratzinger G., Pfaller K., Salvenmoser W., Stössel H., Koch F., Stoitzner P.** (2001). Migration of Dendritic Cells into Lymphatics – The

---

Langerhans Cell Example: Routes, Regulation, and Relevance. *Int. Rev. Cytol.* **207** : 237-270

- **Sato K., Imai Y., Irimura.,** (1998). Contribution of Dermal Macrophage Trafficking in the Sensitation Phase of Contact Hypersensitivity. *J. Immunol.* **161** : 6835 - 6844
  
- **Schiebler T. H., Schmidt W., Zilles K.** (1997). Anatomie Zytologie, Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie des Menschen (7. Auflage) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. ISBN: 3-540-61856-2
  
- **Schneeweiß B.** (2002). Impfen – ganz praktisch. (1. Auflage) UNI-MED Verlag, Bremen. ISBN: 3-89599-592-4
  
- **Seo N., Tokura Y., Nishijima T., Hashizume H., Furukawa F., Takigawa M.** (2000). Percutaneous peptide immunization via corneum barrier-disrupted murine skin for experimental tumor immunoprophylaxis. *PNAS* **97** : 371-376
  
- **Steinman R. M., Nussenzweig M. C.** (2002). Avoiding horror autotoxicus: The importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *PNAS* **99** : 351-358
  
- **Steinman R. M., Pope M.** (2002). Exploiting dendritic cells to improve vaccine efficacy. *J. Clin. Invest.* **109** : 1519 – 1526
  
- **Streilein J. W.** (1978). Lymphocyte Traffic, T-Cell Malignancies and the Skin. *J. Invest. Dermatol.* **71** : 167-171
  
- **Verma D. D.** (2002). Invasomes – Novel Vesicular Carriers for Enhanced Topical Delivery: Characterization and Skin Penetration Properties. Dissertation am Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg

- **Verma D. D., Verma S., Blume G., Fahr A. (2003a).** Liposomes increase skin penetration of entrapped and non entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **55** : 271-277
  
- **Verma D. D., Verma S., Blume G., Fahr A. (2003b).** Partical size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *Int. J. Pharm.* **258** : 141-151

## **Akademische Lehrer:**

Meine akademischen Lehrer am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Basler, Baum, Beato, Becker, Berger, Bertalanffy, Beyer, Bien, Christiansen, Chubayko, Daut, Eilers, Engenhard-Cabillic, Feuser, Gemsa, Geus, Gotzen, Griss, Gudermann, Happle, Hasilik, Havemann, Hellinger, Hesse, Hofmann, Holst, Jungclas, Kern, Klaus, Klenk, Köhler, Koolman, Krause, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lammel, Lang, Lange, Lippert, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pfeiffer, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Seiz, Seyberth, Steininger, Suske, Voigt, Vogelmaier, Weihe, Werner, Westermann, v. Wichert, Wulf.

## **Danksagung:**

Bei Dr. Abdo Konur möchte ich mich für die persönliche Betreuung bedanken. Seine Geduld mir die komplexen Zusammenhänge der Immunologie zu erklären, haben mir bei der Durchführung der Arbeit sehr geholfen. Ohne seine wertvollen Anregungen wäre die Arbeit nicht möglich gewesen. Seine ständige Ansprechbarkeit habe ich sehr geschätzt.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Klaus Havemann. Bei ihm möchte ich mich für die Betreuung, besonders in der Anfangsphase der Arbeit, bedanken. Ohne ihn hätte ich die Arbeit nicht begonnen.

Bei PD Dr. Sabine Müller-Brüsselbach und Prof. Dr. Rolf Müller möchte ich mich für die Ermöglichung dieser Promotion bedanken. Die großzügige Ausstattung mit Labormitteln haben die Arbeit möglich gemacht.

Bei Elisabeth Schmitt-Nau möchte ich mich für die Unterstützung bei der Immunhistochemie, bei Julia Dick für die Hilfe im Tierstall bedanken.

Der Firma vectron-therapeutics möchte ich für die großzügige finanzielle Unterstützung der Arbeit danken. Durch sie konnte ich mich auf die wissenschaftliche Arbeit konzentrieren.

Bei Prof. Dr. Barth möchte ich mich für die kontinuierliche Betreuung als Mentor bedanken. Seine wertvollen Ratschläge und die ständige Ansprechbarkeit haben mir im Studium sehr geholfen.

Mein ganz besonders herzliches Dankeschön gilt meinen Eltern, die mir durch ihr Vertrauen und ihre Unterstützung das Studium und somit auch diese Arbeit ermöglicht haben.